

Universidad Autónoma de Madrid  
Departamento de Bioquímica

**Distroglicanopatías:  
análisis en pacientes, generación del *knockout*  
condicional de *Pomt1* en fotorreceptores, y  
estudios genéticos y funcionales de FKTN y de  
FKRP en células en cultivo**

Marcos Rubio Fernández  
Madrid, 2016.

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid

**Distroglicanopatías: análisis en pacientes, generación del  
*knockout* condicional de *Pomt1* en fotorreceptores, y  
estudios genéticos y funcionales de FKTN y de FKRFP en  
células en cultivo**

Memoria que presenta el licenciado en Bioquímica por la  
Universidad Autónoma de Madrid

**Marcos Rubio Fernández**

para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de tesis  
**Jesús Cruces Pinto**  
Catedrático de Universidad

Departamento de Bioquímica  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Madrid  
Madrid, 2016.





Facultad de Medicina  
Departamento de Bioquímica

D. **Jesús Cruces Pinto**, Catedrático del Departamento de Bioquímica de la Universidad Autónoma de Madrid,

**CERTIFICA:**

Que D. **Marcos Rubio Fernández**, licenciado en Bioquímica, ha realizado bajo mi dirección, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, el trabajo titulado:

**Distroglicanopatías: análisis en pacientes, generación del *knockout* condicional de *Pomt1* en fotorreceptores, y estudios genéticos y funcionales de FKTN y de FKRP en células en cultivo**

Una vez supervisado el trabajo, estoy de acuerdo con los métodos empleados y avalo los resultados obtenidos, y asimismo considero que reúne todos los requisitos necesarios en cuanto originalidad y calidad para ser presentado como tesis doctoral con el objeto de optar al título de Doctor en Bioquímica, Biología Molecular, Biomedicina y Biotecnología (Biociencias Moleculares) por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste a todos los efectos firmo el presente certificado en,

Madrid, 3 de Octubre de 2016

Fdo.: Jesús Cruces Pinto  
Director de la tesis

*A mis padres*

*"La ciencia se construye a partir de aproximaciones que  
gradualmente se acercan a la verdad."  
(Isaac Asimov – Anochecer)*

## *Agradecimientos*

En primer lugar, agradecer a mi director de tesis, Jesús Cruces, la oportunidad que me ha dado de realizar este trabajo. Por permitirme desarrollarme como investigador, enseñarme a no dar nada por seguro y ser crítico con mi trabajo y también por saber comprenderme y apoyarme en los momentos difíciles. A Madalina, por su apoyo y por haber sido la mejor mentora que podría haber tenido. A Lourdes y Cristina, no se cómo voy a hacer para devolveros todas las cosas que habéis hecho por mí, todo el cariño y el afecto que me habéis dado y por todos esos momentos en los que habéis empujado este trabajo cuando yo no podía. A mis “alumnos” (Ana, Sandra, Desirée y Nacho), gracias a los cuales he podido aprender enseñando y sin cuyo trabajo y esfuerzo no habría podido montar esta historia. A Miriam y Laura, por su dedicación en este proyecto. También mi agradecimiento al trabajo y el esfuerzo de José Martín Nieto, Pedro de la Villa, Lluís Montoliu, Javier Vicente Tejedor, Mary Luz y el resto de componentes de sus respectivos grupos, sin los cuales no habría podido acabar el trabajo que tantos años y esfuerzo me han llevado. A José González Castaño y su grupo, por los recursos y el tiempo dedicados para introducirnos en el mundo de la autofagia. A Luis del Peso y Ramón Díaz por su apoyo en la interpretación estadística.

A todos mis compañeros del departamento: Raúl, Ramiro, Alberto, Saras 1 y 2, Pedro, Antonio, Fran, Teresa, Alfredo, César y otros muchos, que me habéis escuchado, apoyado, ayudado y atendido siempre, y que me habéis hecho salir del laboratorio a respirar aire, de corazón mil gracias. A Miguel y a Esther por su apoyo desde el inicio de mi estancia aquí. También agradecer a Lola y Ana (Confo), Toño (Informática) y el resto de servicios técnicos, por su apoyo a la hora de solucionarme los “pequeños” problemas.

A Irene y a Laura (Lala); no me cabrían todas las palabras de agradecimiento aquí pero sabéis lo esenciales que sois para mí y que siempre os agradeceré todo lo que habéis hecho por mí en esta etapa..

A mis amigos del colegio: Almu, Gemma, Rafa, Laura (ambas), David, Rubén, Manolo y Borja; que aún en la distancia (en muchos casos enorme) no habéis dejado de apoyarme todos estos años. Después de tantos años aquí está, ahora toca disfrutarla juntos.

A ese grupo de “biocosas”, como alguien nos nombra (va por usted Sr. Andrés), que nació en la puerta de la facultad hace ya...mejor ni lo digo, y que a día de hoy siguen acompañándome. Creo que no puedo tener mejores recuerdos que de esos años, ni haberme podido quedar con mejor gente. Quiero mencionar, porque así se lo prometí hace unos años, a mi predecesor en el título; Rober, aquí está aquello que te prometí.

Y tampoco me olvido de una especial mención a Barras, Guille y Laura, agapornis míos habéis aguantado carros y carretas y no se cómo agradeceréoslo.

A Ruth, Ana, Lucio, Vir, Guille, Flori y Parras. Gracias por aquel máster, por los viajes, por los mates, por hacerme ver que podía hacer todo aquello que me propusiera. Vuestra

paciencia conmigo, en muchos casos infinita, no sé como agradecerla. Vuestro apoyo ha significado muchísimo para mí, muchas gracias.

A mi pequeña gran familia de teatreros, mi Tras el Telón. Me pondría a escribiros uno por uno pero no sabría parar porque tengo tanto que agradeceros... sois increíbles, y para mí sois el bálsamo que necesitaba para terminar esto. Me habéis dado tanto sin nunca pedir nada a cambio que todavía estoy acostumbrándome. Habéis puesto color, música, alegría, sonrisas y otras muchas cosas en mi vida, habéis hecho algo que no puedo explicar con palabras y que solo puedo experimentar y disfrutar junto a todos vosotros y vosotras. Me habéis hecho emocionarme de nuevo y me habéis permitido entrar en vuestras vidas sin pensarlo. Gracias, gracias y más gracias.

A mi familia política actual, gracias por estar pendientes siempre de mí, por haberme aceptado con tanto cariño y por todos los momentos que juntos hemos pasado.

Y por último, a las tres personas más importantes en mi vida...

A mis padres, que siempre me habéis apoyado y habéis estado ahí cuando os he necesitado. Sois mi referente de luchadores, las personas en las que día a día me miro y a las que intento parecerme. Lo sabéis, pero quizás no digo lo suficiente cuanto os quiero, cuanto os necesito y cuan importantes sois para mí. Sin vosotros no sería quien soy, y sin vuestra confianza, a día de hoy no estaría defendiendo esto. Mucho de lo que hay aquí es vuestro, así que disfrutarlo de la misma forma que yo. Me siento orgulloso de ser vuestro hijo y no creo que hubiera podido tener mejores padres.

Y finalmente a ti, Ángela, no se cómo agradecerte todo. Gracias por estar a mi lado día a día todos estos años, por tu comprensión y por hacerme creer de nuevo en mí. Gracias por mostrarme otra manera de ver la vida, otros caminos y las maravillas que en ellos se esconden. Gracias por querer formar una vida y un futuro junto a mí. Sin ti, tengo la seguridad de que no habría podido terminar. Te quiero y cada día que pasa no puedo más que agradecerte que hayas querido formar parte de mi vida.

¡¡Muchísimas gracias!!

*Resumen / Abstract*

## **Resumen**

Las distroglicanopatías son un grupo heterogéneo de distrofias musculares de herencia recesiva que también pueden presentar en diferentes grados afectación nerviosa y ocular. A nivel molecular se caracterizan por la pérdida de la glicosilación del alfa-distroglicano ( $\alpha$ -DG). El DG es una proteína de la matriz extracelular (MEC) formada por dos subunidades ( $\alpha$ -DG y  $\beta$ -DG) que conecta proteínas de la MEC (p. ej. laminina, perlecano o pikachurina) con el citoesqueleto de actina, a través de su unión citoplasmática a la distrofina. La conexión con las proteínas de la MEC se realiza a través de los residuos glicosílicos, principalmente O-manosilglicanos, presentes en la región mucina del  $\alpha$ -DG.

Hasta la fecha, 18 genes se han relacionado con el proceso de O-manosilación del  $\alpha$ -DG. Entre ellos encontramos genes que codifican tanto glicosiltransferasas como proteínas que intervienen en la generación de compuestos intermedios de la glicosilación. La proteína O-manosiltransferasa 1 (POMT1) es la primera enzima, que conjuntamente con su homóloga POMT2, introduce la manosa inicial. Este monosacárido es esencial para la generación de las diferentes estructuras glicosiladas del  $\alpha$ -DG. Por otra parte, las proteínas FKTN y FKRP son enzimas que actúan en pasos posteriores del proceso de glicosilación. Recientemente se ha descrito que ambas introducen residuos de ribitol 5-fosfato en uno de los residuos del  $\alpha$ -DG. Mutaciones en *POMT1*, *FKTN* y *FKRP* generan desde distroglicanopatías muy graves, como pueden ser el síndrome de Walker-Warburg (WWS) o la distrofia muscular congénita tipo Fukuyama (FCMD), a presentaciones clínicas más leves como las distrofias musculares de cintura tipo 2 (LGMD2).

En este trabajo hemos analizado dos pacientes con sospecha de distroglicanopatía, los cuales finalmente han mostrado un déficit en la vía de autofagia con una alteración en la glicosilación del  $\alpha$ -DG. Este hecho plantea una posible relación entre la glicosilación del  $\alpha$ -DG y esta ruta de degradación.

Por otra parte, hemos generado un modelo *knockout* condicional de ratón para el gen *Pomt1* en los fotorreceptores de la retina. Hemos demostrado cómo la mutación del gen *Pomt1* está asociada a la pérdida de glicosilación del  $\alpha$ -DG, la cual genera una malformación de la sinapsis entre los fotorreceptores y la células bipolares (sinapsis *ribbon*) y una disfunción visual.

Por último, hemos generado líneas celulares de mioblastos de ratón *knockout* para los genes *Fktn* y *Fkrp*. En estas células hemos realizado estudios comparativos de glicoproteómica y del perfil de expresión con el objetivo de aproximarnos a la función de estos genes de una manera indirecta. También hemos llevado a cabo estudios de la señal de retención en el aparato de Golgi de estas proteínas en las líneas silvestres y *knockout*.



## **Abstract**

Dystroglycanopathies are a heterogeneous group of recessive muscular dystrophies which can also present different grades of nervous and ocular affection. At a molecular level, the absence of  $\alpha$ -dystroglycan ( $\alpha$ -DG) glycosylation is the main characteristic of these diseases. Dystroglycan is a matrix extracellular (ECM) protein conformed by two subunits ( $\alpha$ -DG and  $\beta$ -DG), that connects other ECM proteins (such as laminin, perlecan or pikachurin) with the actin cytoskeleton through its cytoplasmatic connection with dystrophin. The interaction with ECM proteins is mediated by its glycan residues, mainly O-mannosylglycans, located in the mucine region of  $\alpha$ -DG.

To date, 18 genes have been related with  $\alpha$ -DG O-mannosylation process. These genes codified for glycosyltransferases or proteins that generate glycosylation intermediates. Protein O-mannosyltransferase 1 (POMT1) is the first enzyme, together with its homologous POMT2, which introduces the initial mannose. This monosaccharide is essential for the generation of different mannosylated cores. On the other hand, FKTN and FKRP are enzymes that act in posterior steps of the glycosylation process. It has recently been described that both of them introduces ribitol 5-phosphate in a specific  $\alpha$ -DG core. Mutations in *POMT1*, *FKTN* and *FKRP* are able to cause from severe dystroglycanopathies, such as Walker-Warburg syndrome (WWS) or Fukuyama congenital muscular dystrophy (FCMD), to less severe dystroglycanopathies like limb-girdle muscular dystrophies type 2 (LGMD2).

In this work, we have analyzed two patients with dystroglycanopathy suspicion. The genetic-molecular characterization has finally revealed an impairment in the autophagy pathway but we have also detected  $\alpha$ -DG glycosylation anomalies. The data seem to highlight a possible relation between autophagy and  $\alpha$ -DG.

On the other hand, we have generated a conditional *knockout* mouse model for *Pomt1* gene in the retinal photoreceptors. We have demonstrated how the mutation of POMT1 is associated with the loss of  $\alpha$ -DG glycosylation, which causes a destructing in the synapsis between both photoreceptor and bipolar cells (ribbon synapsis) and an associated visual impairment.

Finally, we have generated mouse myoblast cell lines *knockout* for *Fktn* and *Fkrp*. In these cell lines we have performed comparative glycoproteomic and transcriptional profile analysis with the aim to approach, indirectly, to the function of these proteins. We have also analyzed the signal for Golgi retention in wild-type and knockout cell lines.

# *Índice*

<b>Abreviaturas .....</b>	<b>27</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>37</b>
<b>1. El distroglicano y el complejo glicoproteico de unión a distrofina (DGC) .....</b>	<b>39</b>
1.1. Distroglicano y su estructura.....	39
1.2. El distroglicano en el complejo glicoproteico de unión a distrofina.....	40
<b>2. La glicosilación del distroglicano .....</b>	<b>42</b>
2.1. N-glicosilación del $\alpha$ -distroglicano.....	43
2.2. O-glicosilación del $\alpha$ -distroglicano.....	44
2.2.1. Glicanos tipo mucina en el $\alpha$ -distroglicano.....	45
2.2.2. O-manosilglicanos en el $\alpha$ -distroglicano .....	45
2.3. Proteínas de la ruta de O-manosilación .....	48
2.3.1. Proteína O-manosiltransferasa 1 (POMT1).....	51
2.3.2. Fukutina (FKTN) y proteína relacionada con la fukutina (FKRP) .....	53
<b>3. Distroglicanopatías. Hipoglicosilación del distroglicano.....</b>	<b>54</b>
<b>4. Modelos animales de distroglicanopatía .....</b>	<b>57</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>59</b>
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>63</b>
<b>Materiales .....</b>	<b>65</b>
<b>1. Pacientes analizados. Características clínicas y anatomopatológicas .....</b>	<b>65</b>
1.1. Paciente 1 .....	65
1.2. Paciente 2 .....	66
<b>2. Cepa bacteriana .....</b>	<b>67</b>
<b>3. Líneas celulares .....</b>	<b>68</b>
3.1. Células madre embrionarias de ratón con modificación en el gen <i>Pomt1</i> .....	68
3.2. Líneas celulares inmortalizadas .....	68
<b>4. Líneas de ratón .....</b>	<b>68</b>
4.1. Líneas consanguíneas (cepas).....	68
4.2. Líneas transgénicas.....	68
4.3. Líneas generadas en esta tesis doctoral.....	69
<b>5. Vectores plasmídicos .....</b>	<b>69</b>
5.1. Vectores de clonación .....	69
5.2. Vectores recombinantes .....	70
<b>6. Oligonucleótidos .....</b>	<b>70</b>
6.1. Oligonucleótidos empleados en el diagnóstico genético .....	71

6.2. Oligonucleótidos empleados en la comprobación de la secuencia de la línea <i>Pomt1</i> EUCOMM .....	71
6.3. Oligonucleótidos para el genotipado de animales .....	72
6.4. Oligonucleótidos empleados en la detección de la eliminación de los exones 3 y 4 de <i>Pomt1</i> en retina .....	72
6.5. Oligonucleótidos empleados en RT-PCR y RT-PCR cuantitativa en <i>Pomt1</i> KOc.....	72
6.6. Oligonucleótidos empleados en la búsqueda de mutantes TALEN en los genes <i>Fktn</i> y <i>Fkrp</i> .....	73
6.7. Oligonucleótidos empleados en la clonación de fragmentos de PCR obtenidos de clones TALEN- <i>Fktn</i> y <i>Fkrp</i> .....	73
6.8. Oligonucleótidos empleados en qPCR en las líneas y clones C2C12 silvestre, KO-29, rC6 y KO-2 .....	74
6.9. Oligonucleótidos empleados en la clonación de secuencias codificantes.....	75
6.10. Oligonucleótidos para secuenciación.....	75
<b>7. Anticuerpos primarios y secundarios.....</b>	<b>75</b>
<b>8. Resina de afinidad.....</b>	<b>77</b>
<b>9. Reactivos, soluciones y tampones .....</b>	<b>77</b>
<b>Métodos.....</b>	<b>77</b>
<b>1. Diagnóstico de pacientes con sospecha de distroglicanopatía.....</b>	<b>77</b>
1.1. Estudio de la expresión de proteínas.....	77
1.1.1. Inmunohistofluorescencia en tejido muscular .....	77
1.1.2. Extracción de proteínas de tejido muscular .....	78
1.1.3. Purificación de proteínas glicosiladas por agarosa WGA .....	78
1.1.4. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (western blot) .....	79
1.2. Extracción de ADN genómico (ADNg) desde sangre.....	80
1.3. Secuenciación masiva de exoma .....	80
1.4. Amplificación y purificación del fragmento de PCR del exón 4 del gen <i>EPG5</i> .....	80
1.5. Secuenciación directa y análisis de secuencias .....	81
<b>2. Generación modelo <i>knockout</i> condicional para el gen <i>Pomt1</i> en retina .....</b>	<b>81</b>
2.1. Mantenimiento de los animales de experimentación .....	81
2.2. Purificación de ADN desde tejidos .....	81
2.3. Generación de animales quimera y de la línea <i>Pomt1</i> EUCOMM .....	82
2.4. Análisis molecular de la secuencia genómica de <i>Pomt1</i> del EUCOMM en los animales.....	83
2.5. Análisis de la correcta construcción de la secuencia <i>Pomt1</i> del EUCOMM.....	84

2.6. Genotipado de las diferentes líneas generadas.....	85
2.7. Detección de la eliminación de los exones 3 y 4 del gen <i>Pomt1</i> .....	85
2.8. Extracción de ARN de retina .....	86
2.9. Transcripción en reverso de ARN total de retina a ADN copia (RT) .....	86
2.10. Estudio de la expresión génica por PCR (RT-PCR) .....	86
2.11. Estudio de la expresión génica por PCR cuantitativa (qRT-PCR).....	87
2.12. Extracción de proteínas de retina .....	88
2.13. Enriquecimiento de proteínas glicosiladas en la retina .....	88
2.14. Electroforesis desnaturizante y WB de proteínas de la retina .....	88
2.15. Recubrimiento con laminina y detección ( <i>laminin overlay</i> ) .....	88
<b>3.- Estudios de la función de Fktn y Fkrp en células C2C12.....</b>	<b>89</b>
3.1. Cultivos celulares y diferenciación a miotubos.....	89
3.2. Generación de la línea C2C12 knockout para <i>Fktn</i> y <i>Fkrp</i> por tecnología TALEN ...	89
3.2.1. Transfección de vectores TALEN .....	89
3.2.2. Corte con enzimas de restricción en células nucleofectadas .....	90
3.2.3. Aislamiento de clones individuales.....	90
3.3. Caracterización de las mutaciones en clones <i>knockout</i> de <i>Fktn</i> y <i>Fkrp</i> .....	91
3.3.1. Clonación de los fragmentos de PCR de clones TALEN <i>Fktn</i> y <i>Fkrp</i> .....	91
3.4. Estudio de la glicosilación del $\alpha$ -dístroglicano en los clones <i>knockout</i> de <i>Fktn</i> y <i>Fkrp</i> .....	92
3.4.1. Análisis de la glicosilación por western blot.....	92
3.4.2. Análisis de la glicosilación por citometría de flujo.....	93
3.5. Rescate de fenotipo en los clones <i>knockout</i> de <i>Fktn</i> y <i>Fkrp</i> .....	93
3.5.1. Generación de clones de sobreexpresión estable .....	93
3.5.2. Estudio de la expresión de <i>Fkrp</i> por qPCR .....	94
3.5.3. Estudio de la expresión de <i>Fkrp</i> por WB y análisis de glicosilación del $\alpha$ -dístroglicano .....	95
3.5.4. Estudio de la expresión proteica por inmunocitofluorescencia.....	95
3.6. Análisis glicoproteómico del $\alpha$ -dístroglicano .....	96
3.7. Estudio transcriptómico .....	97
3.7.1. Análisis por RNAseq y selección de genes candidatos.....	97
3.7.2. Corroboración mediante qRT-PCR de los genes seleccionados del estudio transcriptómico .....	97
3.8. Análisis de la localización de FKRP y FKTN.....	98
3.8.1. Obtención del ARN y generación del ADNc (RT).....	98
3.8.2. Clonación de la secuencias silvestre y mutantes de <i>Fktn</i> y <i>Fkrp</i> .....	98

3.8.3. Transfección de las construcciones plasmídicas .....	99
3.8.4. Análisis de la expresión mediante inmunocitofluorescencia .....	100
<b>Resultados.....</b>	<b>101</b>
<b>1. Estudio genético-molecular de pacientes con sospecha de distroglicanopatía</b>	<b>103</b>
1.1. Análisis de la glicosilación y expresión del distroglicano .....	103
1.1.1. Estudios de inmunohistofluorescencia.....	103
1.1.2. Estudios por <i>western blot</i> .....	103
1.1.3. Análisis de las proteínas de la matriz extracelular en el paciente 1 .....	106
1.2. Búsqueda de genes causantes de enfermedad .....	106
1.2.1. Análisis masivo de exoma.....	107
1.2.2. Análisis por secuenciación directa del gen <i>EPG5</i> .....	108
1.3. Estudio de proteínas de autofagia.....	109
1.3.1. Análisis por <i>western blot</i> de proteínas de autofagia .....	110
1.3.2. Análisis por inmunohistofluorescencia de proteínas de autofagia .....	110
<b>2. Generación de un modelo animal de distroglicanopatía en retina .....</b>	<b>112</b>
2.1. Generación de modelo knockout condicional en retina .....	112
2.2. Estudio de expresión de <i>Pomt1</i> en retina .....	115
2.3. Análisis de glicosilación del $\alpha$ -distroglicano en la retina del ratón <i>Pomt1</i> KOc .....	118
<b>3. Estudio de la función de FKTN y FKRP en la línea celular C2C12 .....</b>	<b>119</b>
3.1. Generación de líneas C2C12 <i>knockout</i> para <i>Fktn</i> y <i>Fkrp</i> .....	119
3.1.1. Diseño y transfección de plásmidos TALEN en mioblastos C2C12 .....	119
3.1.2. Generación de clones individuales y caracterización de las mutaciones.....	121
3.1.3. Análisis de la glicosilación del $\alpha$ -distroglicano .....	123
3.2. Rescate fenotípico de líneas <i>knockout</i> en <i>Fktn</i> o <i>Fkrp</i> .....	125
3.3. Estudio glicoproteómico del distroglicano endógeno en clones <i>knockout</i> de <i>Fktn</i> y <i>Fkrp</i> .....	127
3.4. Estudio transcriptómico. RNAseq de líneas KO- <i>Fktn</i> y KO- <i>Fktn</i> .....	128
3.4.1. Selección de genes en el clon TALEN-KO 29 de <i>Fkrp</i> .....	129
3.4.2. Rescate de la expresión génica .....	130
3.4.3. Análisis del efecto clonal .....	133
3.5. Estudio de la señal de localización de mFKTN y mFKRP .....	135
3.5.1. Generación de construcciones plasmídicas .....	135
3.5.2. Estudio de la localización subcelular de las mutaciones en <i>Fkrp</i> .....	137
<b>Discusión .....</b>	<b>141</b>
<b>1. Estudio genético-molecular de pacientes con sospecha de distroglicanopatía</b>	<b>143</b>

1.1. Paciente 1 .....	143
1.2. Paciente 2 .....	146
<b>2. Generación de modelo <i>knockout</i> condicional de <i>Pomt1</i> en retina .....</b>	<b>148</b>
<b>3. Estudio de la función de mFKTN y mFKRP .....</b>	<b>152</b>
3.1. Análisis comparativo del perfil glicoproteómico .....	153
3.2. Regulación transcripcional por parte de mFKTN y mFKRP .....	154
3.3. Secuencia de localización de mFKRP .....	156
<b>Conclusiones .....</b>	<b>159</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>163</b>
<b>Anexo I .....</b>	<b>185</b>
<b>Anexo II .....</b>	<b>203</b>

## *Abreviaturas*



- 18S** – gen murino de la proteína ribosómica 18S.
- Aa** – aminoácido.
- Actb** – gen murino de la proteína actina beta (en inglés, *actin beta*).
- Actn2** – gen murino de la proteína alfa-actinina 2 (en inglés, *alpha actinin 2*).
- ADNc** – ácido desoxirribonucleico copia.
- ADNg** – ácido desoxirribonucleico genómico.
- α-DG** – Alfa-distroglicano.
- AG** – aparato de Golgi.
- AKT** – proteína quinasa de serinas o treoninas (en inglés, *RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*).
- Ankrd2** – gen murino de la proteína con dominios de repetición anquirina 2 (en inglés, *ankyrin repeat domain 2*).
- ANOVA** – análisis de varianza (en inglés, *analysis of variance*).
- ARNm** – ácido ribonucleico mensajero.
- Asn** – aminoácido asparagina.
- AVM** – miopatías con vacuolas autofágicas (en inglés, *autophagic vacuolar myopathies*).
- β-DG** – Beta-distroglicano.
- B2m** – gen murino de la proteína β-2 microglobulina (en inglés, *β-2 microglobulin*).
- B3GALNT2** – proteína β3-N-acetilgalactosaminiltransferasa 2 (en inglés, *protein β3-N-acetilgalactosaminyltransferase 2*).
- B4GAT1** – proteína β1,4-glucuroniltransferasa (en inglés, *protein β1,4-glucuronyltransferase 1*).
- BGH** – hormona de crecimiento bovina (en inglés, *bovine growth hormone*).
- Bmp4** – gen murino de la proteína de la morfogénesis de hueso 4 (en inglés, *bone morphogenetic protein 4*).
- BSA** – albumina de suero bovino (en inglés, *bovine serum albumin*).
- C2C12** – línea celular inmortalizada de mioblastos de ratón.
- CDG** – desorden congénito de glicosilación (en inglés, *congenital disorder of glycosylation*).
- CF** – citometría de flujo.
- CID-MS/MS o CID-MS/MS/MS** – espectrometría de masas en tándem (o triple) basada en disociación inducida por colisión (en inglés, *collision induced dissociation-mass spectrometry*).
- Ckm** – gen murino de la proteína creatina quinasa tipo-M (en inglés, *creatin kinase M-type*).
- CMV** – citomegalovirus.
- CPK** – creatina fosfoquinasa (en inglés, *creatin-phophokinase*).
- Cre** – recombinasa cre.

**Crx** – gen del factor de transcripción *cone-rod homeobox*.

**Csrp3** – gen murino de la proteína rica en cisteínas y glicinas 3 (en inglés *cysteine and glycine rich protein 3*).

**Ct** – ciclo umbral (en inglés, *cycle threshold*).

**DAG(s)** – Glicoproteína(s) de asociación a distrofina (en inglés, *Dystrophin associated glycoprotein(s)*).

**DAG1** – Nomenclatura oficial HUGO del gen *distroglicano*.

**DAPI** – 4',6-diamino-2-fenilindol (en inglés, *4'6-diamidino-2-phenylindole*).

**DG** – Distroglicano.

**DGC** – Complejo glicoproteico de unión a distrofina (en inglés, *Dystrophin glycoprotein complex*).

**DMD** – distrofia muscular de Duchenne (en inglés, *Duchenne muscular dystrophy*).

**Dmd** – gen murino de la *distrofina* (en inglés, *dystrophin*).

**DMEM** – medio de Dulbecco modificado del medio de Eagle (en inglés, *Dulbecco's modified Eagle's medium*).

**DOLK** – dolicol quinasa (en inglés, *dolichol kinase*).

**DolP** – dolicol-fosfato.

**Dominio LG** – dominios de laminina G.

**DPM1** – polipéptido 1 del complejo dolicol fosfato manosiltransferasa (en inglés, *dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 1*).

**DPM2** – polipéptido 2 del complejo dolicol fosfato manosiltransferasa (en inglés, *dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 2*).

**DPM3** – polipéptido 3 del complejo dolicol fosfato manosiltransferasa (en inglés, *dolichol-phosphate mannosyltransferase subunit 3*).

**ECL** – compuesto para quimioluminiscencia potenciada (en inglés, *enhance chemiluminescence*).

**EDTA** – Ácido etilendiaminotetraacético (en inglés, *ethylenediaminetetraacetic acid*)

**EEG** – electroencefalograma.

**EMG** –electromiograma.

**EN2SA** – aceptor de *splicing* del gen murino *En2* (en inglés, *EN2 splice acceptor*).

**EPG5** – gen humano de la proteína de gránulos ectópicos P 5 (en inglés, *ectopic P-granules 5*).

**EPT** – extracto proteico total.

**ERG** – electrorretinograma.

**EUCOMM** – en inglés, *The European Conditional Mouse Mutagenesis Program*.

- FCMD** – distrofia muscular congénita tipo Fukuyama (en inglés, *Fukuyama congenital muscular dystrophy*).
- FKRP** – proteína relaciona con la fukutina (en inglés, *fukutin-related protein*).
- FKTN** – proteína fukutina (en inglés, *fukutin*).
- FRT** – sitio de reconocimiento para la recombinación por la recombinasa flipasa (en inglés, *flipase recognition site*).
- Fuc** – monosacárido fucosa.
- Gal** – monosacárido galactosa.
- GalNAc** – monosacárido N-acetilgalactosamina.
- GAM** – anticuerpo realizado en cabra contra proteínas de ratón (en inglés, *goat anti-mouse*).
- Gapdh** – gen murino de la proteína gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (en inglés, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*).
- GAR** – anticuerpo realizado en cabra contra proteínas de conejo (en inglés, *goat anti-rabbit*).
- GARat** – anticuerpo realizado en cabra contra proteínas de rata (en inglés, *goat anti-rat*).
- GF** – Oligonucleótido directo específico del gen *Pomt1* (en inglés, *gene specific forward*).
- GFP** – proteína verde fluorescente (en inglés, *Green fluorescence protein*).
- Glc** – monosacárido glucosa.
- GlcA** – monosacárido ácido glucurónico.
- GlcNAc** – monosacárido N-acetilglucosamina.
- GM130** – proteína 130 de matriz del aparato de Golgi (en inglés, *Golgi matrix 130*).
- GMPPB** – GDP manosa pirofosforilasa (en inglés, *mannose 1-phosphate guanyltransferase beta*).
- GNT-IX/Vb** – proteína  $\beta(1,6)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa IX o Vb (en inglés, *N-acetylglucosaminyl-transferase Vb*).
- GOT** – glutamato oxalacetato transaminasa (en inglés, *glutamic oxaloacetic transaminase*).
- GPT** – glutamato pirúvica transaminasa (en inglés, *glutamic pyruvic transaminase*).
- GR** – oligonucleótido reverso específico del gen *Pomt1* (en inglés, *gene specific reverse*).
- Grb2** – proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento (en inglés, *Growth factor receptor-bound protein 2*).
- HEK293T** – línea celular inmortalizada y transformada con el antígeno T de células embrionarias de riñón humano.
- Hex** – monosacárido hexosa (seis carbonos).
- HexNAc** – monosacárido N-acetilhexosamina.
- hLys** – aminoácido modificado hidroxilisina.

- Hmbs** – gen murino de la proteína hidroximetilbilano sintasa (en inglés, *hidroxymethylbilane synthase*).
- HNK1** – epítipo de las células asesinas naturales 1 (en inglés, *human natural killer 1*).
- hPro** – aminoácido modificado hidroxiprolina.
- Hprt1** – gen murino de la proteína hipoxantina fosforribosiltransferasa 1 (en inglés, *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*).
- HS** – suero de caballo (en inglés, *horse serum*).
- HSO<sub>3</sub>-GlcA** – ácido glucurónico modificado por sulfato.
- ICF** – inmunocitofluorescencia.
- Id3** – gen murino de la proteína inhibidora de unión al ADN 3 (en inglés, *inhibitor of binding DNA 3*).
- Ig** – inmunoglobulina.
- IHF** – inmunohistofluorescencia.
- IHQ** – inmunohistoquímica.
- IL-2** – gen murino de la proteína interleuquina 2.
- IRES** – secuencia interna de iniciación del ribosoma (en inglés, *internal ribosome entry site*).
- ISPD** – proteína que contiene el dominio isoprenoide (en inglés, *isoprenoid synthase domain-containing protein*).
- KO** – eliminado (del inglés, *knockout*).
- KOc** – KO condicional
- LacZ** – gen que codifica la enzima beta-galactosidasa.
- LAMP1** – proteína de membrana asociada a lisosomas 1 (en inglés, *lysosomal-associated membrane protein 1*).
- LAR** – oligonucleótido reverso con homología por el “brazo izquierdo” de la construcción EUComm de *Pomt1* (en inglés, *left arm reverse*).
- LARGE** – proteína xilosil- y glucuroniltransferasa 1 (en inglés, *LARGE xylosyl- and glucuronyltransferase 1*).
- LBB** – tampón de unión a lectinas (en inglés, *lectin binding buffer*).
- LBBM2X** – tampón de unión a lectinas modificado y concentrado dos veces (en inglés, *lectin binding buffer-modified 2X*).
- LC3B** – acrónimo de MAP1LC3B, correspondiente con la cadena ligera 3B de la proteína asociada a microtúbulos (en inglés, *microtubule associated protein, light chain 3B*).
- LGMD** – distrofia muscular de cinturas (en inglés, *limb-girdle muscular dystrophy*).
- LoxP** – sitio de reconocimiento para la recombinación por la recombinasa cre.
- LR-PCR** – reacción en cadena de la polimerasa de rango elevado (en inglés, *long range polymerase chain reaction*).

**Man** – monosacárido manosa.

**MDC o CMD** – distrofia muscular congénita (en inglés, *congenital muscular dystrophy*).

**MDDGA** – distrofia muscular-distroglicanopatía tipo A (en inglés, *muscular dystrophy-dystroglycanopathy type A*).

**MDDGB** – distrofia muscular-distroglicanopatía tipo B (en inglés, *muscular dystrophy-dystroglycanopathy type B*).

**MDDGC** – distrofia muscular-distroglicanopatía tipo C (en inglés, *muscular dystrophy-dystroglycanopathy type C*).

**ME** – microscopia electrónica.

**MEB** – enfermedad de músculo-ojo-cerebro (en inglés, *muscle-eye-brain disease*).

**MEC** – matriz extracelular.

**Mef2c** – gen murino del factor promotor de miocitos 2c (en inglés, *myocyte enhancer factor 2c*).

**mFKRP** – proteína relaciona con la fukutina de ratón (en inglés, *murine fukutin-related protein*).

**mFKTN** – proteína fukutina de ratón (en inglés, *murine fukutin*).

**MMP2** – metalopeptidasa de matriz 2 (en inglés, *matrix metallopeptidase 2*).

**MMP9** – metalopeptidasa de matriz 9 (en inglés, *matrix metallopeptidase 9*).

**Neb** – gen murino de la proteína nebulina (en inglés, *nebulin*).

**NeuAc** – monosacárido ácido siálico o ácido N-acetilneuramínico.

**NGS** – suero normal de cabra (en inglés, *normal goat serum*)

**NHEJ** – mecanismo de unión de extremos no homólogos (en inglés, *non-homologous end joining*).

**NMJ** – unión neuromuscular (en inglés, *neuromuscular junction*).

**nNOS** – óxido nítrico sintasa neural (en inglés, *neural nitric oxide synthase*).

**Nov** – gen murino de la proteína sobreexpresada de nefroblastoma (en inglés, *nephroblastoma overexpressed*).

**OCT** – compuesto para cortes a temperaturas bajas (en inglés, *optimal cutting temperature compound*).

**OMIM** – base de datos *online* de genes y enfermedades de herencia mendeliana en humanos (en inglés, *Online Mendelian Inheritance in Man*).

**ONL** – capa nuclear externa (en inglés, *outer nuclear layer*)

**OPL** – capa plexiforme externa (en inglés, *outer plexiform layer*).

**PAS** – ácido peryódico de Schiff (en inglés, *peryodic acid of Schiff*).

**Pb** – pares de bases.

**PBS** – tampón fosfato salino (en inglés, *phosphate buffer saline*).

- PCR** – reacción en cadena de la polimerasa (en inglés, *polymerase chain reaction*).
- PEATC** – técnica de potenciales evocados auditivos del tronco cerebral.
- PEV** – técnica de potenciales evocados visuales.
- PFA** – paraformaldehído.
- PI3K** – fosfoinositol 3 quinasa (en inglés, *phosphoinositide 3 kinase*).
- PMT** – proteína manosiltransferasa (en inglés, *protein mannosyltransferase*).
- POMGNT1** – proteína N-acetilglucosaminiltransferasa 1 a manosa O-unida ( $\beta$  1,2-) (en inglés, *protein O-linked mannose N-acetylglucosaminyltransferase 1 ( $\beta$  1,2-)*).
- POMGNT2** – proteína O-manosa N-acetilglucosaminiltransferasa 2 a manosa O-unida ( $\beta$  1,4-) (en inglés, *protein O-linked mannose N-acetylglucosaminyltransferase 2 ( $\beta$  1,4-)*)).
- POMK** - proteína O-manosil quinasa (en inglés, *protein O-mannose kinase*)
- POMT1** – proteína O-manosiltransferasa 1 (en inglés, *protein O-mannosyltransferase 1*).
- POMT2** – proteína O-manosiltransferasa 2 (en inglés, *protein O-mannosyltransferase 2* ).
- ppGalNAc-T** – proteína/polipéptido N-acetilgalactosaminil transferasa desde UDP-N-acetilgalactosa (en inglés, *UDP-GalNAc polypeptide N-Acetylglactosaminyltransferase*).
- Pro** – aminoácido prolina.
- PS** – péptido señal para la secreción de la proteína.
- PVDF** – polifluoruro de vinilideno (en inglés, *polyvinylidene fluoride*).
- qPCR** – PCR cuantitativa (en inglés, *quantitative PCR*).
- RAF** – oligonucleótido directo con homología por el “brazo derecho” de la construcción EUCOMM de *Pomt1* (en inglés, *right arm forward*).
- RE** – retículo endoplasmático.
- RMN** –resonancia magnética nuclear.
- RNAseq** – secuenciación masiva de ARN.
- Rplp0** – gen murino de la proteína ribosómica, grande, P0 (en inglés, *ribosomal protein, large, P0*).
- RT-PCR** – transcripción en reverso acoplada a PCR (en inglés, *reverse transcription PCR*).
- RVD** – diresiduos de repetición variante (en inglés, *repeat variable diresidues*).
- SDS** – dodecilsulfato sódico (en inglés, *sodium dodecyl sulfate*).
- SDS-PAGE** – electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (en inglés, *SDS-polyacrilamide gel electrophoresis*).
- Ser** – aminoácido serina.
- SNC** –sistema nervioso central.
- SV40 pA** – secuencia de poliadenilación del virus SV40.

**TALEN** – nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (en inglés, *transcription activator-like effector nuclease*).

**TBE** – tampón tris-borato EDTA (en inglés, *tris-borate EDTA*).

**TBS** – tampón salino tris (en inglés, *tris buffer saline*)

**TBS-T** – tampón TBS suplementado con Tween-20.

**TEMED** – tetrametiletilendiamida (en inglés, *Tetramethylethylenediamine*).

**Thr** – aminoácido treonina.

**TM** – dominio transmembrana.

**TMEM5** – proteína transmembrana 5 (en inglés, *transmembrane protein 5*).

**Tnni2** – gen murino de la proteína troponina I2 (en inglés, *troponin I2*).

**Ttn** – gen murino de la proteína titina (en inglés, *titin*).

**Tyr** – aminoácido tirosina.

**WB** – técnica de *western blot*.

**WGA** – aglutinina de germen de trigo (en inglés, *wheat germ agglutinin*).

**WT o wt** – fenotipo o genotipo silvestre (en inglés, *wild-type*).

**WWS** –síndrome de Walker-Warburg (en inglés, *Walker-Warburg Syndrome*).

**Xyl** – monosacárido xilosa.

# *Introducción*



## **1. El distroglicano y el complejo glicoproteico de unión a distrofina (DGC)**

### **1.1. Distroglicano y su estructura**

El distroglicano (DG), denominado inicialmente como cranina, fue descrito por primera vez a finales de los años ochenta como una proteína de unión a laminina purificada desde células y tejido nervioso (Smalheiser and Schwartz, 1987). Posteriormente, estudios en músculo esquelético de conejo definen la organización del complejo glicoproteico de unión a distrofina (DGC) y sus glicoproteínas asociadas (DAGs), y entre ellas al DG, una proteína generada a partir de un único polipéptido que posteriormente genera dos unidades glicosiladas de 43 kDa y 156 kDa (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.*, 1992).

En 1993, Ibraghimov-Beskrovnaya y colaboradores clonan el ARNm humano del DG, descubriendo que está codificado por un único gen (*DAG1*) y que mapea en humanos en el cromosoma 3p21. Este ARNm genera un único polipéptido de 895 aminoácidos, que es procesado post-traduccionalmente, mediante un corte proteolítico en la posición 654, en dos subunidades:  $\alpha$ -distroglicano ( $\alpha$ -DG) y  $\beta$ -distroglicano ( $\beta$ -DG) (Deyst *et al.*, 1995). Aún no se conoce el significado biológico de este procesamiento, pero se ha descrito que es esencial, ya que de no producirse provoca el desarrollo de distrofia muscular (Jayasinha *et al.*, 2003).

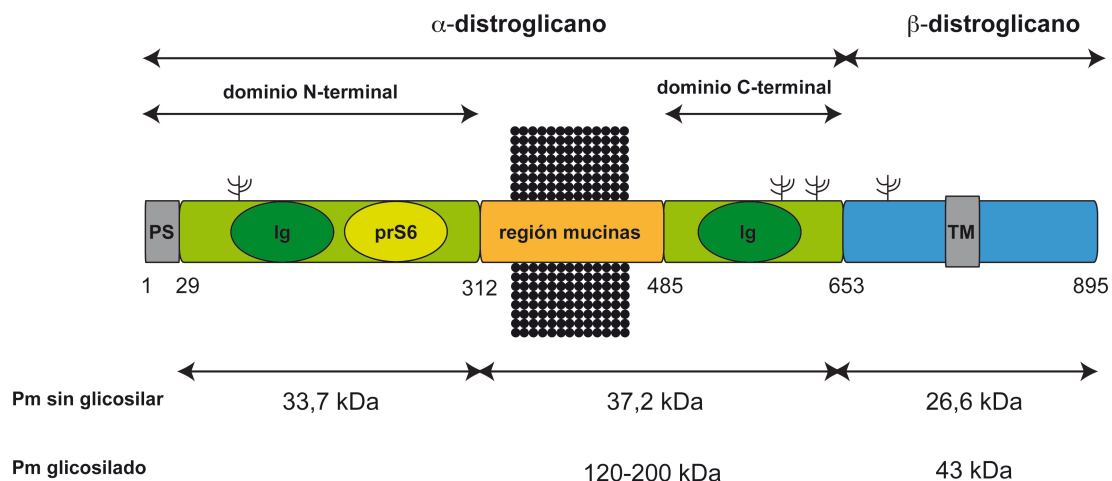
Estructuralmente, la subunidad  $\alpha$ -DG se compone de tres dominios: dos dominios globulares en los extremos N- y C-terminal y una región central con un dominio tipo mucina. El peso molecular predicho del  $\alpha$ -DG por su composición aminoacídica es de aproximadamente 71 kDa, pero por *western blot* (WB) es detectado a un peso superior, en un rango de entre 120-150 kDa dependiendo del tejido (Ibraghimov-Beskrovnaya *et al.*, 1992, Yamada *et al.*, 1994) (**Figura 1**).

Ambos dominios terminales del  $\alpha$ -DG presentan homología con dominios tipo inmunoglobulina (Ig), y en el caso del N-terminal presenta, además, otro subdominio de homología con la proteína ribosómica S6 (Bozic *et al.*, 1998, De Rosa *et al.*, 2011). Este dominio N-terminal es necesario para el reconocimiento por enzimas de la ruta de glicosilación de  $\alpha$ -DG (Kanagawa *et al.*, 2004), y se ha detectado su presencia como péptido libre en el medio de cultivo de diferentes células, así como en el fluido cerebro espinal en humanos (Saito *et al.*, 2008 y 2011). Este corte proteolítico que libera el dominio N-terminal es llevado a cabo por la convertasa furina (Singh *et al.*, 2004) y, aunque su función como péptido libre todavía es desconocida, se ha propuesto que podría utilizarse como biomarcador en diferentes enfermedades neurodegenerativas (Bozzi *et al.*, 2009).

La región central tipo mucina tiene una secuencia de aminoácidos rica en prolinas (Pro), serinas (Ser) y treoninas (Thr) y se encuentra extensamente O-glicosilada

(Brancaccio *et al.*, 1995). Estas diferentes glicosilaciones son las causantes de la variación tan amplia en el tamaño molecular anteriormente mencionado.

La subunidad  $\beta$ -DG presenta un dominio transmembrana (Ervasti and Campbell, 1991) por el que se ancla a la membrana plasmática, quedando así un dominio N-terminal extracelular y un dominio C-terminal citoplasmático (**Figura 1 y 2**). El primero de ellos permite la unión no covalente a la subunidad  $\alpha$ -DG (Sciandra *et al.*, 2001) y puede sufrir un corte proteolítico por las metaloproteasas MMP2 y MMP9 (Yamada *et al.*, 2001), viéndose afectada la unión citoesqueleto-matriz extracelular (MEC). Esta degradación se ha asociado con diferentes patologías (Jing *et al.*, 2004, Matsumura *et al.*, 2003). Por su parte, el extremo citoplasmático es el punto de unión a la proteína distrofina, que se produce a través del motivo PPxY localizado en el extremo C-terminal del  $\beta$ -DG (Jung *et al.*, 1995, Rentschler *et al.*, 1999) y puede verse afectada por fosforilación del residuo de tirosina (Ilsley *et al.*, 2001).

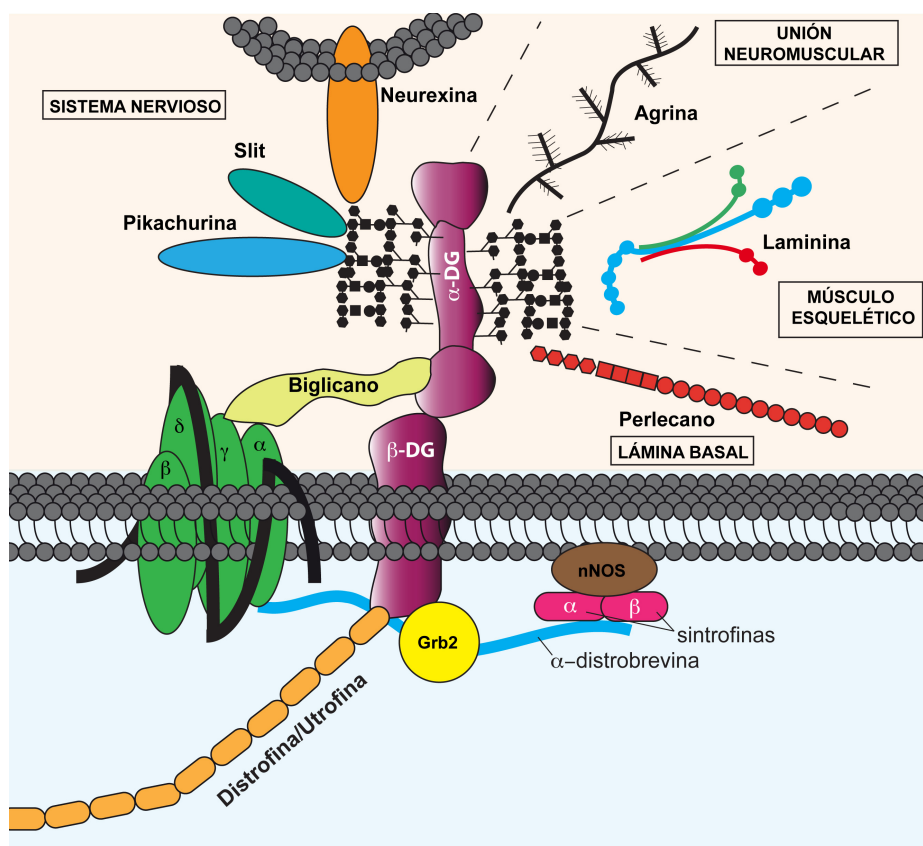


**Figura 1. Estructura del distroglicano (DG).** Este esquema representa ambas subunidades del distroglicano:  $\alpha$ -DG y  $\beta$ -DG. El  $\alpha$ -DG contiene al inicio un péptido señal (PS) y posteriormente se subdivide en tres regiones: dos dominios globulares N- y C-terminales y una región central de mucinas, la cual es el sitio de O-glicosilación (círculos negros). Por su parte,  $\beta$ -DG presenta un dominio transmembrana (TM) por el cual se ancla a la membrana plasmática. Sobre ambas subunidades se representan también los posibles sitios de N-glicosilación (estructuras ramificadas). El dominio N-terminal se separa del resto de subunidades por un corte proteolítico en la posición 312, llevado a cabo por la convertasa furina. En la parte inferior se detallan los pesos moleculares de los fragmentos sin glicosilar, y se muestra también el rango de peso molecular de la región de mucinas más el dominio C-terminal glicosilado y del  $\beta$ -DG maduro. Ig, dominio de homología con inmunoglobulinas; prS6, dominio de homología con la proteína ribosómica S6. Adaptado y actualizado de Barresi and Campbell, 2006.

## 1.2. El distroglicano en el complejo glicoproteico de unión a distrofina.

Como se ha comentado anteriormente, el DG es una proteína clave dentro del DGC, el cual se compone de diferentes proteínas que podemos clasificar en: a) citoplasmáticas, que

incluyen a la distrofina (o su homóloga, la utrofina), las  $\alpha$ 1- y  $\beta$ 1-sintrofina y la  $\alpha$ -distrobrevina; b) transmembranas, en las que destacamos al  $\beta$ -DG, los sarcoglicanos ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -, y  $\zeta$ -sarcoglicano) y el sarcospan; y c) extracelulares en la MEC, que incluyen al  $\alpha$ -DG, el biglicano y la laminina (Rahimov and Kunkel, 2013). Se han descrito otras proteínas de la MEC que se unen al DGC a través del  $\alpha$ -DG, y que varían en función del tejido o estructura, como son: la agrina, el perlecano, la  $\alpha$ -neurexina, slit o la pikachurina (**Figura 2**).



**Figura 2. Complejo glicoproteico de unión a distrofina (DGC).** Esta figura muestra al DG en el contexto del DGC. Se pueden observar las diferentes interacciones que llevan a cabo sus subunidades:  $\alpha$ -DG es capaz de interactuar a través de sus residuos glicosílicos con diferentes proteínas de la MEC (laminina, perlecano, agrina, slit o pikachurina) o con proteínas ancladas en la membrana de otras células (neurexina). Estas interacciones son específicas del tejido o estructura. También,  $\alpha$ -DG interactúa por su dominio globular C-terminal con la proteína biglicano que a su vez interactúa con otras proteínas del DGC como el complejo de sarcoglicanos (en verde). La otra subunidad, el  $\beta$ -DG, interactúa extracelularmente con el  $\alpha$ -DG e intracelularmente con la distrofina (o su homólogo la utrofina), y además con la  $\alpha$ -distrobrevina, que a su vez conecta con los sarcoglicanos y con las sintrofina. Estas últimas sirven de nexo con la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS). Por último, el  $\beta$ -DG también es capaz de interactuar con moléculas señalizadoras como Grb2.

Las funciones del DGC son variadas y dependen del tejido o estructura del que se esté hablando. En el músculo esquelético mantienen la unión del sarcolema a la membrana basal de la MEC, dándole al músculo la estabilidad necesaria para el proceso de contracción

(Rahimov and Kunkel, 2013). Diferentes formas de distrofia muscular están provocadas por la pérdida de esta adhesión, como es el caso de la distrofia muscular tipo Duchenne (DMD), donde mutaciones en la distrofina no solo causan la pérdida de unión con el citoesqueleto, sino que también causan cambios en el resto de componentes del DGC (Matsumura *et al.*, 1993).

Como ya se ha comentado, las funciones dependen del tejido o la estructura, y esto está determinado en parte por el tipo de uniones que genera el DGC con la MEC. Así, en la unión neuromuscular (NMJ), la utrofina y la unión de la agrina a los residuos glicosílicos del  $\alpha$ -DG están implicados en la agrupación de los receptores de acetilcolina (Campanelli *et al.* 1994). Para la definición de los tipos de sinapsis es determinante la interacción de  $\alpha$ -DG con  $\alpha$ -neurexina (Reissner *et al.*, 2014). Por su parte, la unión entre el perlecano y el  $\alpha$ -DG interviene en la formación de diferentes membranas basales (Henry *et al.*, 2001). Por último, la interacción  $\alpha$ -DG/pikachurina en la retina es necesaria para la correcta transmisión de la información visual (Omori *et al.*, 2012). Esta última función será desarrollada en detalle en este trabajo de tesis doctoral.

También es relevante el papel del DGC en la señalización celular. Así, podemos destacar la interacción entre el  $\alpha$ -DG con slit, implicada en el proceso de la guía axonal (Wright *et al.*, 2012), o cómo la unión del  $\alpha$ -DG con la laminina influye en la ruta de señalización de PI3K/AKT (Langenbach and Rando, 2002). También se ha descrito la interacción del  $\beta$ -DG con el receptor del factor de crecimiento Grb2, implicado en la transducción de señales (Russo *et al.*, 2000). Otros componentes del DGC, como el complejo  $\alpha$ -DG/biglicano/sarcoglicanos, o la interacción de sintrofinas y distrobrevina con canales iónicos, o la óxido nítrico sintasa neural (nNOS) tienen un papel en los procesos de señalización (Allikian and McNally, 2007, Carmignac and Durbeej, 2012, Waite *et al.*, 2009).

Por último, se ha descrito que el DGC puede actuar como receptor para la entrada de diferentes agentes patógenos. Los residuos glicosílicos del  $\alpha$ -DG actúan como receptores para *Mycobacterium leprae* (Rambukkana *et al.*, 1998) en las células de Schwann. También el virus de la coriomeningitis linfocítica y otros arenavirus (Cao *et al.*, 1998), así como el virus de la fiebre de Lassa, utilizan los residuos glicosílicos del  $\alpha$ -DG como receptor.

## **2. La glicosilación del distroglicano**

Las modificaciones post-traduccionales sobre las proteínas son uno de los principales mecanismos por los que la célula regula su función. Entre ellos se encuentra la modificación de la secuencia peptídica por adición de residuos azucarados por el proceso denominado glicosilación. Los dos tipos de glicosilación más conocidos son la N-

glicosilación, que se produce sobre el residuo amida del aminoácido asparagina (Asn), y la O-glicosilación, que lo hace sobre los residuos hidroxilo de los aminoácidos Ser y Thr. Aunque las mayoritarias no son las únicas, y existen otros tipos de glicosilación como la C-glicosilación o la fosfoglicosilación (Spiro, 2002). La complejidad de esta modificación no está solamente en el aminoácido al que se unen, sino también en el tipo de glicano que se une, pudiendo encontrar una amplia variedad de residuos unidos a las proteínas (Spiro, 2002). La complejidad también puede verse aumentada por la ampliación de los mismos, tanto para la formación de residuos lineales como ramificados.

La glicosilación es un proceso conservado evolutivamente desde organismos procariotas a eucariotas. En estos últimos se piensa que aproximadamente el 70% del proteoma eucariota podría estar glicosilado (Dell *et al.*, 2010). Aún con ello, la funcionalidad exacta de esta modificación permanece desconocida hoy en día, aunque cada vez más se van conociendo nuevas funciones. Por ejemplo, se sabe que actúa en mecanismos de localización proteica, o que está implicado en el control de la calidad de la proteína (Hanisch and Breloy, 2009, Lehle *et al.*, 2006). Con respecto al DG, ya se ha mencionado que la principal función de su glicosilación es la de interactuar con las proteínas de la MEC, y a lo largo de este apartado se detallará cuáles son los residuos implicados en estas uniones, así como las proteínas o enzimas implicadas en el proceso de glicosilación del  $\alpha$ -DG.

### 2.1. N-glicosilación del $\alpha$ -dístroglicano

Como se ha comentado anteriormente, esta modificación ocurre sobre el aminoácido Asn de las proteínas. La generación de las cadenas glicosílicas tiene lugar en el retículo endoplasmático (RE). Sobre el sustrato dolicolifosfato (DolP) se unen dos residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc), a los que se van añadiendo hasta 9 residuos de manosa (Man), ramificados o no, seguido de 3 residuos de glucosa (Glc). A continuación, todo este oligosacárido es transferido sobre el aminoácido Asn de la proteína. Posteriormente, en el aparato de Golgi (AG), este oligosacárido se procesa, de manera que se eliminan cierto número de manosas y se añaden otros azúcares como GlcNAc, galactosa (Gal) y ácido siálico (NeuAc).

El DG contiene varios sitios potenciales para la N-glicosilación, localizados tanto en el  $\alpha$ -DG como en el  $\beta$ -DG (Barresi and Campbell, 2006) (**Figura 1**). El tratamiento con enzimas que eliminan los residuos N-glicosílicos solo provoca una disminución de 4 kDa en el peso molecular del  $\alpha$ -DG, por lo que el gran aumento en su tamaño molecular anteriormente mencionado no es debido a ésta pequeña modificación (Ervasti and Campbell, 1991). Además, la eliminación con tratamiento con N-glicanasas no afecta a su

función en la unión de proteínas de la MEC, por lo que estos residuos N-glicosílicos tampoco están implicados en la unión de moléculas como la laminina (Ervasti and Campbell, 1993). De la misma forma, la subunidad  $\beta$ -DG tiene un peso predicho para su secuencia de aminoácidos de 26,6 kDa mientras que por WB se observa a 43 kDa, por lo que la N-glicosilación de sus sitios potenciales tampoco explicaría el aumento en su peso molecular, debiendo existir otras posibles modificaciones sobre  $\beta$ -DG.

## 2.2. O-glicosilación del $\alpha$ -dístroglicano

La modificación por O-glicosilación consiste en la adición de un residuo azucarado a los grupos hidroxilo de los aminoácidos Ser y Thr principalmente, aunque también puede realizarse sobre tirosina (Tyr) o sobre aminoácidos modificados como hidroxilisina (hLys) o hidroxiprolina (hPro) (Spiro, 2002). En la O-glicosilación, a diferencia de la N-glicosilación, los residuos van añadiéndose secuencialmente en vez de transferirse en bloque a la proteína.

Los diferentes tipos de O-glicanos se diferencian en función de diferentes características: el aminoácido al que se unen, el tipo de enlace entre el aminoácido y el azúcar y el tipo de glicano que se une. En la **Tabla 1** se recogen algunos ejemplos de estos O-glicanos unidos sobre Ser, Thr o hLys en glicoproteínas eucariotas.

**Tabla 1. Ejemplos de O-glicanos presentes en eucariotas**

O-glicano inicial	Aminoácido	Enlace	Glicoproteínas
GalNAc	Ser/Thr	alfa	Mucinas y $\alpha$ -DG
GlcNAc	Ser/Thr	beta	Proteínas nucleares y citoplasmáticas
Gal	Ser/Thr	alfa	Colágeno
Man	Ser/Thr	alfa	Pared celular de levaduras y $\alpha$ -DG
Fuc	Ser/Thr	alfa	Factores de coagulación
Glc	Ser	beta	Factores de coagulación
Xyl	Ser	beta	Proteoglicanos
Gal	hLys	beta	Colágenos

GalNAc (N-acetilgalactosamina), GlcNAc (N-acetilglucosamina), Gal (galactosa), Man (manosa), Fuc (fucosa), Glc (glucosa), Xyl (xilosa), Ser (serina), Thr (treonina), hLys (hidroxilisina). Información extraída de Spiro, (2002).

Los dos principales O-glicanos encontrados sobre el  $\alpha$ -DG son los O-N-acetilgalactosaminil glicanos (glicanos de tipo mucina), y los O-manosilglicanos. A continuación se detallarán más en profundidad estas modificaciones sobre el  $\alpha$ -DG.

### **2.2.1. Glicanos tipo mucina en el $\alpha$ -dystroglicano.**

Estos glicanos se han denominado así por ser característicos de estas proteínas de la mucosa tisular. Todos ellos comienzan por N-acetilgalactosamina (GalNAc) unida por un enlace covalente alfa a los residuos de Ser o Thr. Sobre la GalNAc inicial pueden añadirse otros azúcares diferentes, y, en función del azúcar añadido, el enlace y/o ramificaciones que se generan entre los azúcares, se pueden diferenciar hasta ocho tipos de núcleos o *cores* de mucina (Brockhausen, 1999). Estos *cores* también pueden verse modificados posteriormente por otros azúcares como ácido siálico o fucosa (Fuc).

Estos O-glicanos son introducidos por una familia de enzimas residentes en el AG, la familia ppGalNAc-T (*UDP-GalNAc polypeptide N-Acetylglactosaminyltransferase*) (Raman *et al.*, 2012). Se ha demostrado que las isoformas ppGalNAc-T1, -T3 y -T5 pueden reproducir los O-glicanos descritos en el  $\alpha$ -DG (Tran *et al.*, 2012).

Esta modificación parece restringirse a la zona C-terminal del dominio central de mucinas del  $\alpha$ -DG de diferentes especies (Gomez Toledo *et al.*, 2012), aunque esta restricción parece estar dirigida por la O-manosilación (Tran *et al.*, 2012).

En cuanto a la función de los O-glicanos de tipo mucina, se sabe que pueden influir en el desarrollo en eucariotas (Tabak, 2010). Sin embargo, para el  $\alpha$ -DG no se han descrito funciones específicas, si bien se ha publicado que influyen en el proceso de agrupación de los receptores de acetilcolina en la unión neuromuscular, aunque no lo hacen por interacción directa con la laminina (McDearmon *et al.*, 2003).

### **2.2.2. O-manosilglicanos en el $\alpha$ -dystroglicano**

La O-manosilación fue descrita por primera vez en los años 60 en extractos de la pared de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura del pan) (Sentandreu and Northcote, 1969), y durante muchos años se pensó que era propia de los hongos y levaduras, ya que solo se había descrito un péptido iniciado por manosa purificado a partir de cerebro de rata (Finne *et al.*, 1979). Esta modificación suponía hasta el 30% de los O-glicanos cerebrales y presentaba estructuras del tipo Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-3Man-O-Ser/Thr, modificadas terminalmente por NeuAc, fucosa y/o sulfato.

No fue hasta los años 90 que se purificó el  $\alpha$ -DG procedente de nervio periférico bovino (Chiba *et al.*, 1997) y de músculo esquelético de conejo (Sasaki *et al.*, 1998), y se descubriera un nuevo O-manosilglicano: el tetrasacárido NeuAc $\alpha$ 2-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man1-O-Ser/Thr. Los estudios en músculo esquelético revelaron que este tetrasacárido era el O-glicano mayoritario sobre la región de mucinas del  $\alpha$ -DG, suponiendo hasta el 66% de los O-glicanos sialilados. Conjuntamente con este tetrasacárido se detectaron también O-



glicanos de tipo mucina.

Desde este descubrimiento, otros estudios fueron ampliando la información sobre los residuos O-manosilados del  $\alpha$ -DG, pero ha sido en estos últimos años, gracias a la utilización de la espectrometría de masas, que el conocimiento sobre esta modificación ha aumentado ostensiblemente. A día de hoy se han descrito tres diferentes tipos de residuos O-manosilados o *cores* M sobre  $\alpha$ -DG (Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2013), y que se detallan a continuación:

#### Cores M1 y M2

Estos dos residuos O-manosilados se explican conjuntamente, ya que el *core* M2 consiste en una ramificación del *core* M1 (**Figura 3**).

El *core* M1 propiamente dicho está formado por el trisacárido Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man1-O-Ser/Thr. Como se ha mencionado anteriormente, una de las principales modificaciones terminales que presenta este *core* es el NeuAc, aunque también se han encontrado en extractos cerebrales modificaciones con fucosa que generan epítomos de Lewis X (Gal $\beta$ 1-4(Fuc $\alpha$ 1-3)GlcNAc $\beta$ 1-2Man1-O-Ser/Thr) (Smalheiser *et al.*, 1998) o la presencia de ácido glucurónico 3-sulfatado, generando un epítomo HNK1 (HSO<sub>3</sub>-3GlcA $\beta$ 1-3-Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2Man1-O-Ser/Thr) (Yuen *et al.*, 1997).

Por su parte, el *core* M2 ha sido descrito como un residuo específico del sistema nervioso, consistente en la ramificación del *core* M1 por otro residuo de GlcNAc en la posición 6 de la manosa y posterior adición de galactosa (Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-2(Gal $\beta$ 1-4GlcNAc $\beta$ 1-6)Man1-O-Ser/Thr. Fue purificado y descrito en primer lugar procedente de cerebro de conejo (Chai *et al.*, 1999) y se ha confirmado su presencia en el cerebro de diferentes modelos *knockout* de ratón (Stalnaker *et al.*, 2011). Respecto a las modificaciones terminales, éstas pueden presentar NeuAc o epítomos HNK1.

En cuanto a la funcionalidad de estos residuos, se pensó que el *core* M1 sialilado, debido a su gran abundancia, debía estar implicado en la unión a la laminina, y así parecía ser ya que el tratamiento con sialidasas eliminaba la interacción con la laminina (Yamada *et al.*, 1996). Sin embargo, otros estudios más recientes de tratamiento combinado con diferentes glicosilasas demuestran que la eliminación de este residuo no afectaba a la unión con laminina, sino que, al contrario, potenciaba la unión de la misma (Combs and Ervasti, 2005). Lo que sí parece estar claro es que la generación de este *core* M1 es necesaria para la unión de laminina, ya que mutaciones en la glicosiltransferasa que introduce el residuo de GlcNAc causan problemas en la unión a la misma (Yoshida-Moriguchi and Campbell, 2015).

Para el *core* M2, se ha propuesto que puede intervenir en la unión a la laminina, pero no a la laminina-2, sino a otras isoformas como la laminina 10/11 (McDearmon *et al.*,



2006), aunque la eliminación de la ramificación no parece afectar a la unión  $\alpha$ -DG/laminina en el modelo *knockout* (KO) para la enzima responsable de la ramificación (Lee *et al.*, 2012).

Por último, las terminaciones con epítomos HNK-1 o estructuras de Lewis X podrían cumplir diferentes funciones ya descritas para ellos, como la plasticidad sináptica (Morita *et al.*, 2008) o la unión a lectinas presentes en moléculas de adhesión (Taylor and Drickamer, 2007).

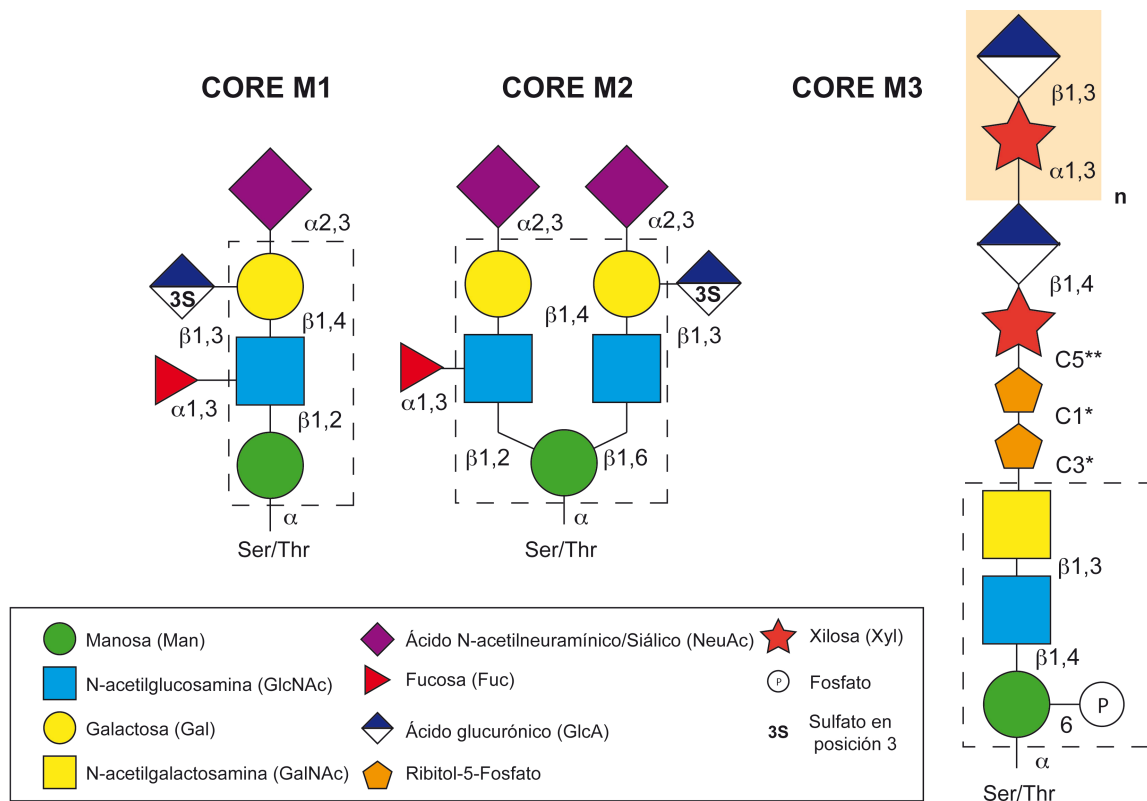
### Core M3

Este *core* ha sido el último en ser descrito, pero parece ser el más relevante de los tres, ya que sería el encargado de la interacción directa con las proteínas de la MEC. Una de las características principales de este *core* es la fosforilación de la posición 6 de la manosa inicial (**Figura 3**).

Este residuo O-fosfomanosilado fue descrito por espectrometría de masas tras sobreexpresar y aislar del medio de cultivo diferentes construcciones de  $\alpha$ -DG en la línea celular HEK293T (Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2010). En este mismo estudio se corroboró que este residuo fosforilado está implicado en la unión a laminina, ya que el tratamiento químico con ácido fluorhídrico acuoso (HF aq), que elimina enlaces fosfoéster, elimina la unión de la laminina al  $\alpha$ -DG. Para que se produzca esta fosforilación en el C6 de la manosa es necesario que previamente se forme el *core* M3 propiamente dicho, consistente en GalNAc $\beta$ 1-3GlcNAc $\beta$ 1-4Man1-*O*-Ser/Thr (Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2013).

En cuanto a sus residuos terminales, hasta el momento se conoce que presenta terminalmente una repetición en tándem de número indeterminado de un disacárido compuesto por xilosa y ácido glucurónico ([Xyl $\alpha$ 1-3Glc $\beta$ 1-3]*n*), el cual se ha propuesto denominarlo como “matriglicano” (Yoshida-Moriguchi and Campbell, 2015). Aunque se desconoce su longitud, se sabe que este parámetro es importante para la interacción con la laminina (Goddeeris *et al.*, 2013), concretamente con los dominios tipo LG, los cuales también están presentes en otras proteínas de la MEC, como el perlecano o la agrina (Harrison *et al.*, 2007). Esta repetición en tándem se localiza sobre un residuo de ácido glucurónico, unido a otra xilosa anterior. Estos dos últimos azúcares indicados no están introducidos por la misma enzima que añade el tándem xilosa/glucurónico, ya que el enlace encontrado es diferente. El nexo de unión entre ellos y el *core* M3 es otro tándem, en este caso de un residuo que no se había identificado hasta la fecha, una repetición de ribitol-5-fosfato. Ambos residuos se encuentran unidos entre sí y el primero de ellos al residuo de GalNAc mediante enlaces fosfodiéster.

Al igual que lo comentado en el caso de los O-glicanos de tipo mucina, distintos autores han definido la posición en la que se produce la modificación por estos diferentes



**Figura 3. Estructuras *core* de O-manosilglicanos en el  $\alpha$ -DG.** Se representan las diferentes estructuras detectadas sobre la región de mucinas del  $\alpha$ -DG que comienzan por manosa. Los *cores* M1 y M2 son similares, siendo el M2 una ramificación en la posición 6 de la manosa del *core* M1. El *core* M3 es el residuo de unión a la laminina y presenta en la posición 6 de la manosa un fosfato, y una repetición en tándem de xilosa y ácido glucurónico terminales de número todavía desconocido (recuadro de fondo naranja). Rodeado por una línea discontinua se muestra la estructura *core*, considerando lo que queda fuera de ella como residuos terminales. En todos los *cores* se muestra el tipo de enlace covalente detectado; en el caso del M3, los enlaces C3\* y C1\* hacen referencia a enlaces fosfodiéster, el primero sobre el carbono 3 del residuo de GalNAc y el segundo sobre el carbono 1 de la ribosa fosfato. El enlace C5\*\* hace referencia al enlace éster entre el carbono 5 del ribitol y la xilosa. La figura se acompaña de una leyenda de símbolos explicativa de cada uno de los residuos y de algunas de las modificaciones sobre ellos. Figura adaptada y actualizada de Yoshida-Moriguchi & Campbell (2015) y Taniguchi-Ikeda *et al.* (2016).

### 2.3. Proteínas de la ruta de O-manosilación

La O-manosilación del  $\alpha$ -DG es un proceso complejo llevado a cabo por un número elevado de proteínas, mayoritariamente glicosiltransferasas residentes en el RE o en el AG.

En la **Tabla 2** se recogen las proteínas relacionadas hasta el momento con el proceso de O-manosilación del  $\alpha$ -DG, la mayoría de las cuales han sido descubiertas al caracterizarse mutaciones en pacientes con deficiencia en la glicosilación del DG. Estas patologías serán comentadas más adelante en esta Introducción.

**Tabla 2. Genes y funciones relacionadas con la O-manosilación de  $\alpha$ -DG**

Gen	Función
Proteína O-manosiltransferasa 1 ( <i>POMT1</i> )	O-manosiltransferasa sobre Ser/Thr
Proteína O-manosiltransferasa 2 ( <i>POMT2</i> )	O-manosiltransferasa sobre Ser/Thr
Proteína N-acetilglucosaminiltransferasa 1 a manosa O-unida ( $\beta$ 1,2-) ( <i>POMGNT1</i> )	Transferencia de GlcNAc sobre O-manosa (enlace $\beta$ 1-2)
Proteína N-acetilglucosaminiltransferasa 2 a manosa O-unida ( $\beta$ 1,4-) ( <i>POMGNT2</i> )	Transferencia de GlcNAc sobre O-manosa (enlace $\beta$ 1-4)
Fukutina ( <i>FKTN</i> )	Transferencia ribitol-5P sobre GalNAc
Proteína relacionada con fukutina ( <i>FKRP</i> )	Transferencia ribitol-5P sobre ribitol-5-P
Proteína xilosil- y glucuroniltransferasa 1 ( <i>LARGE</i> )	Transferencia de ácido glucurónico (enlace $\beta$ 1-3-) y xilosa (enlace $\alpha$ 1-3)
$\beta$ 3-N-acetilgalactosaminiltransferasa 2 ( <i>B3GALNT2</i> )	Transferencia GalNAc (enlace beta1-3)
$\beta$ 1,4-glucuroniltransferasa ( <i>B4GAT1</i> )	Transferencia de ácido glucurónico (enlace $\beta$ 1-4)
Proteína O-manosil quinasa ( <i>POMK</i> )	Fosforilación de O-manosa
Proteína que contiene dominio isoprenoide sintasa ( <i>ISPD</i> )	Síntesis de CDP-ribitol
Proteína transmembrana 5 ( <i>TMEM5</i> )	Transferencia de xilosa
Polipéptido 1 de la dolicol-fosfato manosiltransferasa ( <i>DPM1</i> )	Transferencia de manosa sobre dolicol fosfato
Polipéptido 2 de la dolicol-fosfato manosiltransferasa ( <i>DPM2</i> )	Transferencia de manosa sobre dolicol fosfato
Polipéptido 3 de la dolicol-fosfato manosiltransferasa ( <i>DPM3</i> )	Transferencia de manosa sobre dolicol fosfato
Dolicol quinasa ( <i>DOLK</i> )	Fosforilación de la molécula dolicol
GDP manosa pirofosforilasa B ( <i>GMPPB</i> )	Fosforilación de GDP-manosa

La presencia de un péptido señal en el DG (aa 1-29, en humanos; **Figura 1**) nos indica que éste sigue la ruta de secreción típica de las proteínas, en las cuales están implicados principalmente el RE y el AG. En la **Figura 4** se resumen las localizaciones de las principales enzimas, así como el residuo que añaden sobre  $\alpha$ -DG. En la generación de todos los *cores* M, el primer residuo introducido es la manosa, el cual es añadido sobre las Ser y Thr por las dos únicas O-manosiltransferasas descritas hasta la fecha en mamíferos, las proteínas O-manosiltransferasas 1 (*POMT1*) y 2 (*POMT2*), ambas localizadas en el RE y que funcionan como heterodímero (Manya *et al.*, 2004). Hasta hace poco tiempo se pensaba que el DG continuaba su progresión hacia el AG para continuar con la modificación de estas manosas. El descubrimiento de los *cores* M3 y de las enzimas que lo llevan a cabo detalló

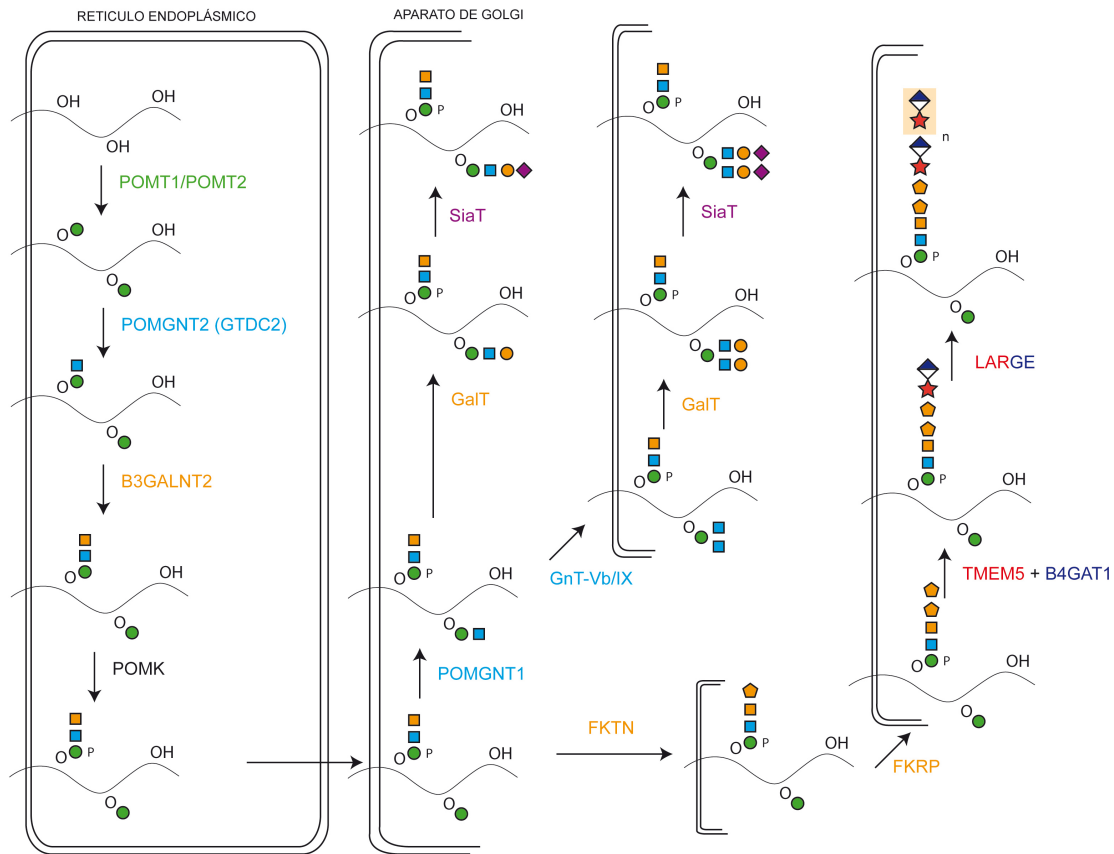
que el DG también es ya modificado en el RE por la acción de las glicosiltransferasas POMGNT2 (GTDC2), B3GALNT2 y la quinasa POMK, que generan el *core* M3.

Este polipéptido glicosilado pasa al AG donde continúa su modificación. Sobre aquellas manosas que no se han modificado como *core* M3 actúa POMGNT1 añadiendo GlcNAc, y le continúa la adición de Gal por una galactosiltransferasa todavía no descubierta. En este punto se generan los diferentes residuos terminales, que se generan por la acción de fucosiltransferasas (Fuc, residuo Lewis X), sialidasas (NeuAc) o la combinación de glucuroniltransferasas y la sulfotransferasa HNK1-ST (epítipo HNK1). Para el *core* M2, la enzima que lleva a cabo la ramificación sobre la manosa es la GNT-IX (o GNTVb), y de nuevo sobre este *core* ramificado actúan las enzimas comentadas para el *core* M1.

Paralelamente, la generación de los residuos terminales del *core* M3 (los de unión a dominios LG de la laminina) se lleva a cabo principalmente por la glicosiltransferasa dual LARGE (Inamori *et al.*, 2012), que se encarga de sintetizar el “matriglicano” (residuos en tándem de ácido glucurónico y xilosa). Para que LARGE actúe, es necesario que existan unos glicanos de “cebado” compuestos por el tándem de ribitol 5-fosfato/xilosa/ácido glucurónico, éste último transferido por la enzima B4GAT1 (Praisman *et al.*, 2014). Hasta la fecha, se había supuesto que otras proteínas relacionadas con el DG, como TMEM5, ISPD, FKTN o FKRP (estas dos últimas objeto de estudio de esta tesis doctoral) intervenían de algún modo en la síntesis de estos glicanos de “cebado” para LARGE. Ha sido a lo largo de los años 2015-2016 cuando se ha descubierto la función de todas ellas. ISPD se ha descrito como una enzima necesaria para la síntesis de un producto intermedio de la glicosilación (CDP-ribitol) (Riemersma *et al.*, 2015a). Este producto es necesario para la acción de dos de las proteínas a estudio, FKTN y FKRP, que introducen consecutivamente los residuos de ribitol-5-fosfato (Gerin *et al.*, 2016). Como es entendible, este resultado finaliza uno de los objetivos marcados en este trabajo de esta tesis doctoral, por lo que en el apartado Discusión se verá como concuerda este descubrimiento con los resultados obtenidos por el doctorando.

La última de las enzimas cuya ha función ha sido descrita es TMEM5. Ésta actúa como xilosiltransferasa (Praisman *et al.*, 2016) y añade el residuo de xilosa sobre el ribitol-5-fosfato añadido por FKRP. Esta xilosa es sobre la que añade el ácido glucurónico la enzima B4GAT1, a partir del cual actúa ya la enzima dual LARGE.

A continuación se detallarán más en profundidad las tres proteínas objetivo de esta tesis doctoral: POMT1, FKTN y FKRP.



**Figura 4. Ruta O-manosilación del  $\alpha$ -DG.** Se muestran las diferentes O-manosilaciones del  $\alpha$ -DG, así como las enzimas encargadas de la generación de cada uno de estos residuos. En primer lugar, en el RE se produce la O-manosilación sobre diferentes OH de Ser o Thr, llevada a cabo por el heterodímero POMT1/POMT2. En este mismo orgánulo actúan POMGNT2, B3GALNT2 y POMK, generando el core M3. Posteriormente el  $\alpha$ -DG pasa al AG donde continua la generación/terminación de los diferentes cores: para el core M1, primero actúa POMGNT1 sobre un residuo de manosa libre, y sobre esta modificación actúan galactosiltransferasas (GalT) y sialiltransferasas (SiaT) todavía no identificadas. El core M2 presenta un paso anterior a la acción de GalTs y SiaTs, y es la ramificación llevada a cabo por GnT-Vb/IX. En el caso del core M3, FKTN y FKRP actúan consecutivamente añadiendo el tándem de ribitol-5-fosfato. Sobre este tándem TMEM5 añade xilosa, y sobre ésta B4GAT1 añade un residuo de ácido glucurónico. Este último sirve de residuo de “cebado” para la acción de LARGE, una enzima dual que añade en tándem residuos de xilosa y ácido glucurónico un número todavía indeterminado de veces. En esta figura se han representado por separado cada uno de los cores pero la generación de los mismos sucede simultáneamente, siendo necesaria la generación de cada uno de ellos para que el resto se pueda formar. La leyenda de símbolos puede verse en la anterior Figura 3. Figura adaptada y actualizada de Yoshida-Moriguchi & Campbell (2015).

### 2.3.1. Proteína O-manosiltransferasa 1 (POMT1)

Como se comentó en el apartado 2.2.2. de esta Introducción, la O-manosilación fue descubierta en levaduras, y es llevada a cabo por la familia de proteínas manosiltransferasas (PMTs). En levaduras esta familia se subdivide en tres subfamilias con diferentes miembros: PMT1 (pmt1 y pmt5), PMT2 (pmt2, pmt3 y pmt6) y PMT4 (pmt4) (Lehle *et al.*, 2006). En organismos superiores, la descripción en *Drosophila melanogaster* del fenotipo *rotated abdomen* (rt), con problemas en la miogénesis, llevó a la clonación del

gen *rt*, con homología por las PMTs de levadura (Martín-Blanco and García-Bellido, 1996). El descubrimiento de este gen *rt* permitió posteriormente encontrar su ortólogo en humanos, el gen que codifica la proteína O-manosiltransferasa 1 (POMT1) (Jurado *et al.*, 1999).

En mamíferos, la síntesis de O-manosilglicanos está llevada a cabo únicamente por dos enzimas, la ya mencionada POMT1 y su homóloga POMT2; ambas con relación con miembros de las subfamilias PMT4 y PMT2 de levadura, respectivamente. De la misma forma que en levaduras, ambas son proteínas residentes del RE, al cual se anclan mediante siete dominios transmembrana. Estas enzimas catalizan la adición de manosa sobre Ser y Thr usando como sustrato el dolicol-fosfato-manosa (Dol-P-Man), sintetizado por el complejo dolicol fosfato manosa sintasa (DPMs) y la dolicol fosfato quinasa (DOLK).

La principal proteína diana de esta modificación es el  $\alpha$ -DG, aunque recientemente se han identificado otros sustratos como el fosfacano, un proteoglicano condroitín-sulfato (Dwyer *et al.*, 2012) o, más interesantemente, las moléculas de adhesión cadherinas y protocadherinas (Lommel *et al.*, 2013, Vester-Christensen *et al.*, 2013). Todo esto parece indicar que la O-manosilación tiene un papel importante en la modificación de las proteínas de membrana.

Para que se produzca la adición de manosa parece ser necesaria la acción conjunta de POMT1 y POMT2, las cuales actuarían como un heterocomplejo (Manya *et al.*, 2004) que colocaliza en el RE y que también coinmunoprecipita conjuntamente (Akasaka-Manya *et al.*, 2006). Recientes investigaciones parecen no coincidir con este hecho, la mutación de residuos importantes para la función o formación de complejos parecen haber descubierto funciones diferentes en POMT1 y POMT2 (Akasaka-Manya *et al.*, 2011). Para la regulación de esta función, se ha predicho mediante modelos de estructura secundaria, que tanto POMT1 como POMT2, presentarían distintos sitios de N-glicosilación los cuales serían importantes para el mantenimiento de estas proteínas en el RE (Manya *et al.*, 2010).

En cuanto a la estructura de POMT1, como se ha comentado ya, es una proteína del RE con siete dominios transmembrana, los cuales fueron propuestos en función del modelo de Pmt1 de *S. cerevisiae* (Strahl-Bolsinger and Scheinost, 1999). Basado en esto, POMT1 tendría hasta 6 lazos o *loops*, tres de ellos orientados al lumen del RE y los otros tres al citoplasma. Dos de los lazos en el RE, el *loop* 1 y el *loop* 5 parecen ser esenciales en levaduras para la actividad glicosiltransferasa (Girrbach *et al.*, 2000). El *loop* 5 contiene tres dominios conservados denominados MIR (por estar presentes en **M**anosiltransferasas, **R**eceptores de **I**P3 y **R**eceptores de **I**nanodina), aunque su función en la O-glicosilación todavía no ha sido descrita.

En cuanto a la expresión de POMT1, se ha demostrado la presencia de su ARNm en

estadios tempranos del desarrollo del ratón así como en el adulto (Prados *et al.*, 2007) y también durante la embriogénesis del pollo (Izquierdo-Lahuerta *et al.*, 2016). En ratón, el ARNm de *Pomt1* está presente en diferentes tejidos como el músculo esquelético o cardíaco, el cerebro, el ojo y también en el acrosoma de los espermatozoides (Prados *et al.*, 2007). La función de POMT1 en el desarrollo del ratón se ha visto que es esencial, ya que la ausencia de esta proteína en estadios tempranos impide la formación de la membrana de Reichert, generándose letalidad embrionaria (Willer *et al.*, 2004).

Por último, la relación de POMT1 con el DG se descubrió gracias a la caracterización de diferentes pacientes, que portando mutaciones en este gen presentaban hipoglicosilación o ausencia de la misma sobre el DG, siendo *POMT1* uno de los primeros genes descritos como causante de distroglicanopatías (Beltrán-Valero de Bernabé *et al.*, 2002). Estos primeros pacientes presentaban una sintomatología muy grave, asociada con el síndrome de Walker-Warburg (WWS). Posteriormente también se encontraron otros pacientes con mutaciones en *POMT1* y que presentaban características definidas para otros síndromes como la enfermedad de músculo-ojo-cerebro (MEB) (Godfrey *et al.*, 2007). Todo ello hacía pensar en un primer momento que *POMT1* era un gen causante de las distroglicanopatías más graves, con importantes afectaciones musculares, cerebrales y oculares. Estudios posteriores han descubierto pacientes con mutaciones en *POMT1* que también presentan distrofias musculares menos graves, como las distrofias musculares de cintura tipo 2K (LGMD2K) (Bello *et al.*, 2012).

### **2.3.2. Fukutina (FKTN) y proteína relacionada con la fukutina (FKRP)**

FKTN y su proteína relacionada, FKRP, son dos proteínas de la ruta de glicosilación del  $\alpha$ -DG cuya función ha permanecido desconocida hasta recientemente (Gerin *et al.*, 2016). El gen *FKTN* fue descrito en primer lugar como causante de una distrofia muscular congénita muy grave, la distrofia muscular tipo Fukuyama (FCMD) (Kobayashi *et al.*, 1998), pero no fue hasta más adelante cuando se relacionó la FCMD con el  $\alpha$ -DG (Hayashi *et al.*, 2001). Por su parte, el gen *FKRP* fue descrito utilizando a FKTN como base para la búsqueda de genes relacionados (Brockington *et al.*, 2001a). Clínicamente, las primeras descripciones de mutaciones en *FKRP* relacionadas con el  $\alpha$ -DG se realizaron en pacientes con distrofias musculares congénitas más leves que la FCMD, como son la distrofia muscular congénita 1C (MDC1C) o la distrofia de cinturas 2I (LGMD2I) (Brockington *et al.*, 2001b).

Estructuralmente ambas proteínas guardan relación con proteínas glicosiltransferasas de fosfoazúcares debido a la presencia de un dominio LicD, propio de bacterias y relacionado con la modificación de glicoproteínas. Dentro de este dominio se encuentra un motivo aminoacídico DxD propio de glicosiltransferasas (Aravind and Koonin,



1999). Revisiones posteriores para su clasificación han incluido a FKTN y FKRP dentro de la superfamilia de nucleotidil transferasas, proteínas que catalizan la transferencia de nucleósidos monofosfato desde nucleósidos trifosfato; en concreto forman parte del grupo XXIII de esta superfamilia (Kuchta *et al.*, 2009). Ambas son proteínas transmembrana tipo II, ancladas a la membrana plasmática por su extremo N-terminal, lo cual significa que el motivo catalítico DxD, quedaría hacia el lumen del RE o el AG. En relación a esta localización los primeros estudios localizaron ambas proteínas en el AG (Esapa *et al.*, 2002), postulando que la misma es debida a la presencia de unos aminoácidos básicos (dos argininas en FKRP) en la región inicial de la proteína. Este tipo de secuencia también está presente en FKTN y otras glicosiltransferasas del AG (Esapa *et al.*, 2002). Por otra parte, otros autores han observado a FKRP en miotubos C2C12 y en el músculo esquelético como residente del RE (Matsumoto *et al.*, 2004). La localización en el AG de FKTN parece estar más consensuada (Tachikawa *et al.*, 2012, Xiong *et al.*, 2006), aunque también se ha descrito su presencia en el núcleo de células tumorales (Yamamoto *et al.*, 2008). Por su parte, la localización de FKRP está a debate, mientras algunos autores aseguran que es una proteína de RE (Torelli *et al.*, 2005), otros mantienen la localización en el AG (Dolatshad *et al.*, 2005), incluso la han descrito como proteína asociada al DGC en la membrana (Beedle *et al.*, 2007), o como proteína de secreción en el medio de cultivo (Kobayashi *et al.* 1998; Lu *et al.* 2010).

Ya hemos comentado que mutaciones en *FKTN* están relacionadas con una grave distrofia muscular, la FCMD; mientras que mutaciones en *FKRP* han sido relacionadas preferentemente con presentaciones clínicas mas leves como la MDC1C o la LGMD2I. Pero al igual que en el caso de *POMT1*, otras manifestaciones clínicas también han sido descritas para estos genes. Así, podemos encontrar pacientes con mutaciones en *FKTN* sin problemas cerebrales (Mercuri *et al.*, 2009) o incluso que desarrollan una distrofia de cinturas (LGMD2M) (Godfrey *et al.*, 2007). Para *FKRP* también podemos mutaciones que dan lugar a las presentaciones clínicas muy graves como WWS (Beltran-Valero de Bernabe *et al.* 2004).

### **3. Distroglicanopatías. Hipoglicosilación del distroglicano**

Como se ha podido deducir de los apartados anteriores, la mayoría del trabajo realizado en relación al DG y su glicosilación ha sido debido a la existencia de pacientes. El descubrimiento de mutaciones en diferentes genes que dan lugar a una característica común como es la afectación de la glicosilación del  $\alpha$ -DG ha permitido definir el concepto de distroglicanopatía.

Las distroglicanopatías son un grupo heterogéneo de enfermedades raras con herencia recesiva. Se caracterizan todas ellas por problemas musculares (distrofia muscular) y una afectación, en diferente grado, del sistema nervioso y ocular. Los



síndromes más graves relacionados con las distroglicanopatías son el síndrome de Walker-Warburg (WWS), la enfermedad de músculo-ojo-cerebro (MEB) y la distrofia muscular congénita tipo Fukuyama (FCMD); todos tienen en común importantes problemas musculares, del sistema nervioso y diversas malformaciones oculares. También, como se ha comentado anteriormente, algunas distrofias musculares congénitas (MDC) con menor grado de afectación cerebral se han incluido en el conjunto de las distroglicanopatías. De la misma forma, distrofias musculares de cintura de herencia recesiva (LGMD tipo 2) han sido relacionadas con mutaciones en el DG o en genes implicados en su glicosilación. Esta clasificación ha sido utilizada durante mucho tiempo en clínica, y a día de hoy todavía se sigue usando. Pero, debido al descubrimiento de nuevos genes causantes de las mismas, gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación masiva, la base de datos OMIM que recoge la información de genes y enfermedades de herencia mendeliana ha propuesto una nueva clasificación. Ésta refiere a todas las distroglicanopatías como “distrofias musculares de tipo distroglicanopatía” (MDDG). Este término va seguido de una letra: la A la para las más graves (que incluiría WWS, MEB o FCMD), la B para las de gravedad intermedia (MDCs), y la C para las de menor gravedad (LGMDs). En las **Tablas 34 y 35 (Anexo I)** se recogen algunos de los principales síntomas clínicos de cada una de las MDDGA, B o C. Se quiere destacar que en todas ellas (MDDGA, -B y -C) la característica común es la ausencia de detección de glicosilación sobre el  $\alpha$ -DG, aunque también lo son los niveles elevados de la creatina quinasa sérica (característica común en distrofias musculares), o la presencia de lisencefalia tipo II en las MDDGA.

En último lugar, para diferenciar el gen que se encuentra afectado, se ha asignado un número a cada uno de los genes que se han relacionado con distroglicanopatía. En la **Tabla 3** se detallan los genes relacionados, sus patologías asociadas, los códigos OMIM, Orphanet y MDDG asignados, y las primeras referencias de estas enfermedades.

**Tabla 3. Genes implicados en distrofias musculares tipo distroglicanopatías (MDDG)**

Gen	Patologías asociadas	Orphanet	MIM	Núm. OMIM	Referencias
<b>POMT1</b>	WWS	899	MDDGA1	#236670	(Beltrán-Valero de Bernabé <i>et al.</i> , 2002, Kim <i>et al.</i> , 2004, Mercuri <i>et al.</i> , 2009)
	MEB	588			
	CMD-CRB	370959	MDDGB1	#613155	(D’Amico <i>et al.</i> , 2006)
	CMD-MR	370968			
	LGMD2K	86812	MDDGC1	#609308	(Balci <i>et al.</i> , 2005)
<b>POMT2</b>	WWS	899	MDDGA2	#613150	(Clement <i>et al.</i> , 2008b, Yanagisawa <i>et al.</i> , 2009)
	MEB	588			
	CMD-CRB	370959	MDDGB2	#613156	(Martinez <i>et al.</i> , 2014, Yanagisawa <i>et al.</i> , 2009)
	CMD-MR	370968			
	LGMD2N	206559	MDDGC2	#613158	(Biancheri <i>et al.</i> , 2007)

Tabla 3. Genes implicados en distrofias musculares tipo distroglicanopatías (MDDG) (Cont.)

Gen	Patologías asociadas	Orphanet	MIM	Núm. OMIM	Referencias
<b>POMGNT1</b>	WWS	899	MDDGA3	#253280	(Clement <i>et al.</i> , 2008b, Mercuri <i>et al.</i> , 2009)
	MEB	588			
	CMD-CRB	370959	MDDGB3	#613151	(Mercuri <i>et al.</i> , 2009)
	LGMD2O	206564	MDDGC3	#613157	(Clement <i>et al.</i> , 2008a, Raducu <i>et al.</i> , 2012)
<b>FKTN</b>	FCMD	272	MDDGA4	#253800	(Cotarello <i>et al.</i> , 2008, Godfrey <i>et al.</i> , 2007, Vuillaumier-Barrot <i>et al.</i> , 2009)
	WWS	899			
	MEB	588			
	CMD-no MR	370980	MDDGB4	#613152	(Godfrey <i>et al.</i> , 2007, Mercuri <i>et al.</i> , 2009)
	LGMD2M	206554	MDDGC4	#611588	(Godfrey <i>et al.</i> , 2006, Vuillaumier-Barrot <i>et al.</i> , 2009)
<b>FKRP</b>	WWS	899	MDDGA5	#613153	(Beltran-Valero de Bernabe, 2004, van Reeuwijk <i>et al.</i> , 2010)
	MEB	588			
	CMD-CRB	370959	MDDGB5	#606612	(Mercuri <i>et al.</i> , 2003)
	CMD-MR	370968			
	CMD-no MR	370980			
	MDC1C	52428	MDDGC5	#607155	(Poppe <i>et al.</i> , 2003, Sveen <i>et al.</i> , 2006)
	LGMD2I	34515			
<b>LARGE</b>	WWS	899	MMDGA6	#613154	(Clement <i>et al.</i> , 2008b, Godfrey <i>et al.</i> , 2007)
	MEB	588			
	CMD-MR	370968	MDDGB6	#608840	(Clarke <i>et al.</i> , 2011)
	MDC1D	98894			
<b>ISPD</b>	WWS	899	MDDGA7	#614643	(Vuillaumier-Barrot <i>et al.</i> , 2012)
	MDC	NI*	MDDGB7	NI*	(Baranello <i>et al.</i> , 2015)
	LGMD2U	352479	MDDGC7	#616052	(Tasca <i>et al.</i> , 2013)
<b>POMGNT2</b>	WWS	899	MDDGA8	#614830	(Manzini <i>et al.</i> , 2012)
<b>DAG1</b>	WWS	899	MDDGA9	NI*	(Riemersma <i>et al.</i> , 2015b)
	LGMD2P	280333	MDDGC9	#613818	(Dinçer <i>et al.</i> , 2003, Hara <i>et al.</i> , 2011)
<b>TMEM5</b>	WWS	899	MDDGA10	#615041	(Vuillaumier-Barrot <i>et al.</i> , 2012)
<b>B3GALNT2</b>	WWS	899	MDDGA11	#615181	(Stevens <i>et al.</i> , 2013a)
	MEB	588			
<b>POMK</b>	WWS	899	MDDGA12	#615249	(Di Costanzo <i>et al.</i> , 2014)
	CMD-MR	370968	MDDGB12	NI*	(von Renesse <i>et al.</i> , 2014)
	LGMD	NI*	MDDGC12	#616094	(Di Costanzo <i>et al.</i> , 2014)
<b>B4GAT1 (B3GNT1)</b>	WWS	899	MDDGA13	#615287	(Buysse <i>et al.</i> , 2013)
<b>GMMPB</b>	MEB	588	MDDGA14	#615350	(Carss <i>et al.</i> , 2013)
	CMD-CRB	370959	MDDGB14	#615351	(Carss <i>et al.</i> , 2013)
	CMD-MR	370968			
	LGMD2T	363623	MDDGC14	#615352	(Carss <i>et al.</i> , 2013)

Símbolos: WWS, síndrome de Walker-Warburg; MEB, enfermedad músculo-ojo-cerebro; FCMD, distrofia muscular congénita tipo Fukuyama; MDC, distrofia muscular congénita; LGMD, distrofia muscular de cinturas; CMD-CRB, distrofia muscular congénita con afectación cerebelar; CMD-MR, distrofia muscular congénita con retraso mental; CMD-no MR, distrofia muscular congénita sin retraso mental; NI\*: no incluida ni en ORPHANET ni en OMIM.

En la **Tabla 3** no se han incluido los genes *DPM1*, *DPM2*, *DPM3* y *DOLK*, implicados también en el proceso de O-glicosilación del  $\alpha$ -DG (**Tabla 2**), ya que no están incluidos por OMIM como MDDG sino como desórdenes congénitos de glicosilación (CDGs). Mutaciones en estos genes son responsables de las CDG1E (*DPM1*), CDG1U (*DPM2*), CDG1O (*DPM3*) y CDG1M (*DOLK*).

#### **4. Modelos animales de distroglicanopatía**

Una manera de aproximación al estudio de las distroglicanopatías ha sido la generación de animales modelo. Estos animales reproducen ya sean las mutaciones encontradas en diferentes pacientes (*knock-in*), o bien la eliminación completa de un gen en concreto (KO constitutivo), o la eliminación de ese gen en tejidos específicos (KO condicional). En relación a los genes a estudio en esta tesis doctoral, *POMT1*, *FKTN* y *FKRP*, haremos una revisión de algunos de los modelos que han sido generados.

Para *POMT1*, nuestro grupo, intentó la generación de un modelo *knockout* constitutivo para el gen *Pomt1* (Willer *et al.*, 2004). Sin embargo, la falta de este gen demostró ser letal en el desarrollo de los roedores al afectar a la formación de la membrana de Reichert, una membrana extraembrionaria esencial para el desarrollo del embrión. En cambio, sí ha sido posible la generación de un modelo en pez cebra para *Pomt1*, mediante la utilización de morfolinós, reproduciendo los fenotipos más graves de las MDDGA. y confirmando por tanto la conservación de la O-manosilación en organismos no mamíferos (Avşar-Ban *et al.*, 2010). Desde la publicación de la letalidad embrionaria del KO constitutivo para *Pomt1* ningún grupo ha presentado otro modelo en roedor para este gen, de ahí el interés en esta tesis doctoral en la generación de un modelo KO condicional para el gen *Pomt1* en ratón. Por su parte, *POMT2*, el homólogo funcional de *POMT1*, también presenta letalidad embrionaria en su modelo murino (Hu *et al.*, 2011), habiéndose generado también el modelo KO condicional para este gen en cerebro (Hu *et al.*, 2011).

En cuanto a *FKTN*, el modelo *knockout* constitutivo también produce letalidad embrionaria por problemas en la formación de la membrana de Reichert (Kurahashi *et al.*, 2005). En este caso, una manera de intentar superar esta letalidad antes de la generación de un modelo KO condicional fue la generación de animales quimera con alto porcentaje de células con la mutación en *Fktn* (Chiyonobu *et al.*, 2005). Estos animales son viables en cierto porcentaje y reproducen varios de los síntomas de las distroglicanopatías. Otro modelo interesante para el gen *FKTN* es el modelo de ratón que porta el retrotransposón por el cual se definió la FCMD (Kanagawa *et al.*, 2009). Este modelo es viable y presenta un cierto grado de glicosilación en el  $\alpha$ -DG, si bien no es completa. Este mutante ha sido utilizado para experimentos de terapia génica sobreexpresando el gen *LARGE*, el cual

parece rescatar de alguna forma la glicosilación sobre el  $\alpha$ -DG (Brockington *et al.*, 2010). El modelo KO condicional de *FKTN* en el músculo (Beedle *et al.*, 2012) ha demostrado la importancia de la glicosilación del  $\alpha$ -DG en el desarrollo de este tejido, ya que la pérdida en diferentes momentos del desarrollo provoca diferencias en la gravedad de los síntomas. Por último, también se han generado modelos para *FKTN* en otras especies, como es el pez cebra (Lin *et al.*, 2011), descubriendo un papel de esta proteína en la respuesta a proteínas mal plegadas y de estrés de retículo.

Para FKRP, Los primeros modelos animales utilizados en el estudio de este gen fueron en pez cebra (Moore *et al.*, 2008), y permitieron descubrir la conservación de los genes de glicosilación en este organismo. Así mismo, modelos KO generados por morfolinós en esta especie (que no presentaría la membrana de Reichert) permitieron reproducir los síntomas causados por las mutaciones en este gen (Thornhill *et al.*, 2008). También, como en el caso de *FKTN*, modelos en pez cebra de *Fkrp*, han relacionado a esta proteína con la respuesta a proteínas mal plegadas (Lin *et al.*, 2011). Por otro lado, los modelos en ratón de *Fkrp* han permitido observar la variación fenotípica de diferentes mutaciones descritas en pacientes (Blaeser *et al.*, 2013), encontrándose mutaciones que causan letalidad embrionaria, otras de muerte perinatal o incluso algunas que, siendo patogénicas en humanos, no lo son en ratones.

Otros modelos para otros genes de la glicosilación del  $\alpha$ -DG también han sido generados. Así, podemos encontrar modelos espontáneos o naturales en ratón para el gen *Large*, como son *Large<sup>myd</sup>* o *Large<sup>vl</sup>* (Lee *et al.*, 2005), que han sido muy utilizados en estudios oculares o para terapia. También se ha generado un modelo *knockout* constitutivo en ratón para el gen *Pomgnt1* (Liu *et al.*, 2006), el cual, a diferencia de algunos de los anteriormente mencionados, no es letal embrionario. En otras especies podemos encontrar modelos en pez cebra para el gen *Pomgnt2* (*Gtdc2*) (Manzini *et al.*, 2012) que permitió confirmar su papel en la ruta de glicosilación del  $\alpha$ -DG. O la utilización de un modelo distrófico de pollo para estudiar la relación de la glicosilación del  $\alpha$ -DG con estas enfermedades (Saito *et al.*, 2005).

En conclusión, la utilización de animales modelo ha permitido conocer y avanzar mucho en el campo del estudio de las distroglicanopatías, y son herramientas que podrían permitir la generación de una posible terapia.

## *Objetivos*

En este trabajo de tesis doctoral se han marcado los siguientes objetivos:

1. Diagnóstico genético-molecular de pacientes con sospecha de distroglicanopatía.
  - Análisis de la glicosilación del  $\alpha$ -distroglicano.
  - Estudio mutacional mediante secuenciación masiva de exoma.
  - Estudios moleculares para comprobar la correlación genotipo-fenotipo.
2. Generación de modelo *knockout* condicional del gen *Pomt1* en fotorreceptores de la retina.
  - Generación de la línea *knockout* condicional del gen *Pomt1*.
  - Caracterización molecular de la línea *knockout* condicional.
3. Estudio de la función de mFKTN y mFKRP en la línea celular de mioblastos de ratón C2C12.
  - Generación de líneas *knockout* para *Fktn* y *Fkrp* mediante la tecnología TALEN
  - Estudio mutacional de la líneas generadas.
  - Caracterización del estado de glicosilación del  $\alpha$ -distroglicano en las líneas *knockout* generadas.
  - Análisis glicoproteómico comparativo del  $\alpha$ -distroglicano en las líneas generadas.
  - Estudio transcriptómico comparativo en ambas líneas.
  - Estudio de la señal de localización en el aparato de Golgi de mFKTN y mFKRP.

## *Materiales y Métodos*

## **Materiales**

### **1. Pacientes analizados. Características clínicas y anatomopatológicas**

El trabajo realizado con muestras humanas ha sido autorizado por el comité de ética de la Universidad Autónoma de Madrid. Las pruebas diagnósticas solicitadas por nuestro laboratorio han sido realizadas con el consentimiento informado de las familias de los pacientes.

#### **1.1. Paciente 1**

Este paciente fue remitido para su diagnóstico desde el Servicio de Neuropediatría del Hospital Universitario La Paz (HULP). El paciente era un varón de origen filipino que falleció a los 18 meses, de familia no consanguínea y sin problemas en el parto. El desarrollo fue normal hasta los dos meses y medio de edad, momento en el que se diagnosticó un problema en el sistema nervioso.

Los resultados de la resonancia magnética (RMN) revelaron una alteración de la línea media con ausencia del cuerpo calloso, alteraciones en el plegamiento cortical, vermis cerebelar pequeña, aumento de la cisterna magna y retraso en la mielinización. El estudio de potenciales evocados visuales (PEV) mostró una alteración de la mielinización con una disminución de la amplitud, pudiendo deberse a una atrofia o hipoplasia del nervio óptico. La prueba de potenciales evocados auditivos de tronco cerebral (PEATC) también mostró desestructuración. El estudio del electroencefalograma (EEG) mostró una afectación cerebral generalizada con anomalías epileptiformes bilaterales. Los estudios metabólicos fueron normales, con excepción de un aumento persistente de las transaminasas (GOT y GPT), y un aumento de la creatina quinasa (CPK, 450-1.500 U/L).

Estudios complementarios también mostraron anomalías oftalmológicas (cataratas bilaterales centrales y atrofia óptica) y anomalías cardíacas (hipertrofia ventricular no obstructiva). Se realizó también una biopsia muscular, sobre la que los estudios de la cadena respiratoria y el ADN mitocondrial fueron normales. Las tinciones contra merosina y distrofina no mostraron resultados anómalos.

Tras el fallecimiento, el estudio anatomopatológico detalló resultados macroscópicos y microscópicos interesantes: en el SNC, macroscópicamente, no se apreció alteración en el patrón de circunvoluciones (no había presencia de lisencefalia). Se apreció una buena diferenciación entre la corteza y la sustancia blanca. Se detectó una gran dilatación del tercer ventrículo y los ventrículos laterales. La sustancia blanca de todos los lóbulos se encontró muy adelgazada. Por su parte, el cerebelo presentó un vermis más



pequeña pero con conservación de la laminación. También presentó una disminución en el espesor de la sustancia blanca.

A nivel microscópico se mantiene la conservación de la arquitectura de la corteza cerebral. La sustancia blanca tiene disminución de la mielinización fundamentalmente en las zonas profundas, en contraste con una mejor mielinización de las fibras U; pudiendo sugerir esto una desmielinización frente a hipomielinización. En los cortes de tejido se apreciaron fibras de sustancia blanca que unían ambos hemisferios.

En los núcleos de la base se identifican “bolas” eosinófilas, algunas de ellas positivas a la tinción por ácido peryódico de Schiff (PAS), y también para neurofilamentos y ubiquitina. En el cerebelo también se encontraron estas “bolas” eosinófilas, principalmente en la capa molecular, y sus características inmunohistoquímicas son similares a la de los núcleos de la base.

En el estudio del corazón se destaca la presencia miocitos vacuolizados PAS y *Oil Red* negativos en la zona subendocárdica. Por su parte, el músculo esquelético, presentaba una ligera sustitución adiposa, una ligera fibrosis endomisial y una moderada variabilidad de fibras. Había escasa centralización nuclear y no se apreciaron vacuolas claras. Las técnicas inmunohistoquímicas de rutina no determinaron resultados anómalos.

## **1.2. Paciente 2**

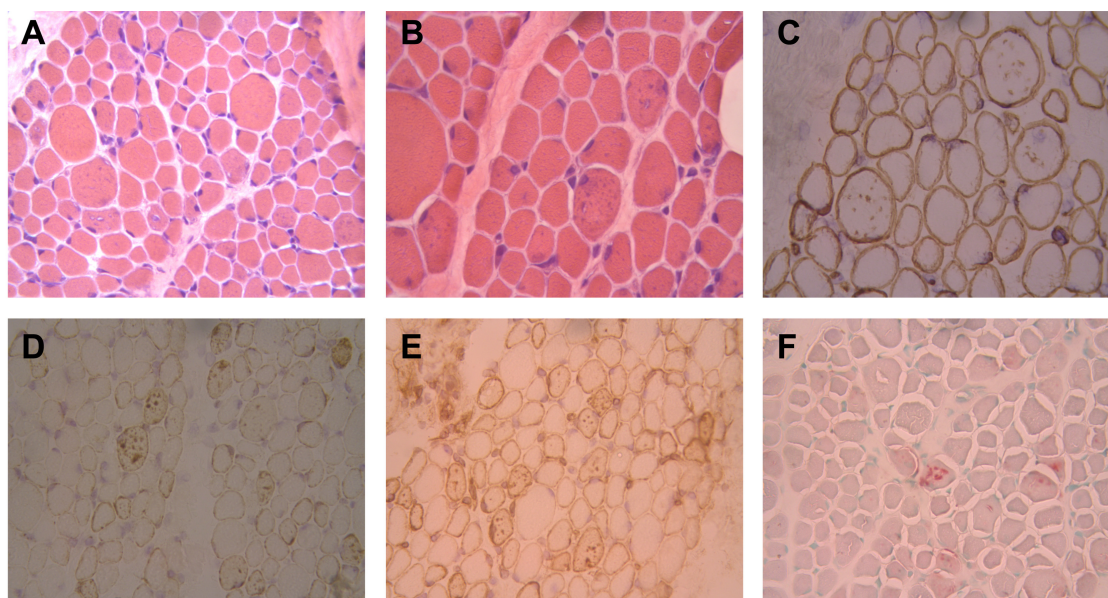
El segundo paciente que se presenta en este trabajo fue remitido desde el Servicio de Neurología Pediátrica del Hospital Universitario 12 de Octubre.

El paciente es un varón de 2 años de edad, de origen español y de familia no consanguínea. Durante el embarazo se observó una reducción de los movimientos fetales en último trimestre. A los 4 meses, en el periodo neonatal inmediatamente posterior, fue llamativa la hipertonía y el desarrollo de crisis epilépticas, Las pruebas metabólicas fueron normales con excepción de un aumento en la CPK (1.534-1.775 U/L)

Desde el punto de vista del neurodesarrollo, el paciente presentó un retraso psicomotor importante, sin adquisición de sedestación y con un control céfalico incompleto. Las pruebas de RMN craneal determinaron una microcefalia, con ampliación del espacio extraaxial y ventriculomegalia supratentorial. También presentó una disminución del espesor de la sustancia blanca y adelgazamiento difuso del cuerpo caloso.

El estudio de EEG indicó una encefalopatía epiléptica con mayor afectación de la parte posterior bilateral. La evaluación oftalmológica detalló un retraso cognitivo visual con diferentes problemas en la motilidad ocular y la presencia de cataratas bilaterales pequeñas.

La evaluación cardiológica fue normal, pero el electromiograma (EMG) mostró signos de afectación miopática. La primera biopsia muscular realizada al año de vida mostró regiones con tejido fibroadiposo sin infiltrados inflamatorios y con alguna zona de vacuolización. Las pruebas inmunohistoquímicas realizadas para sarcoglicanos, laminina-2 y distrofina no mostraron alteraciones. En una segunda biopsia, realizada a los 3 años de edad, se identificaron fibras de diferente tamaño (**Figura 5A**), siendo ahora más frecuente la presencia de vacuolas (vacuolas *rimmed* o con bordes) en el sarcoplasma de las fibras (**Figura 5B**). Estas vacuolas son positivas para espectrina, desmina y p62 (**Figuras 5C-E**), presentando un aumento de la actividad de la fosfatasa ácida (**Figura 5F**). Las técnicas oxidativas no identificaron alteraciones significativas y no hubo evidencia de depósitos con las técnicas PAS y *Oil Red*. La tinción contra distrofina, merosina, caveolina, colágeno VI, disferlina y sarcoglicanos fue normal.



**Figura 5. Estudios inmunohistoquímicos en la biopsia muscular del paciente 2.** (A) Tinción con hematoxilina-eosina donde se aprecia la diferencia de tamaño entre las fibras. (B) Vacuolas con borde (*rimmed*) en el interior de las fibras. (C) Tinción contra espectrina donde se aprecian acúmulos en el interior de las fibras. (D) Desmina acumulada en el interior de las fibras musculares. (E) Marcaje con p62 donde ésta se observa acumulada en el interior de las fibras. (F) Detección de fosfatasa ácida reactiva en el interior de algunas fibras musculares. (Imágenes cedidas por el Servicio de Anatomía Patológica del H.U. 12 de Octubre).

## **2. Cepa bacteriana**

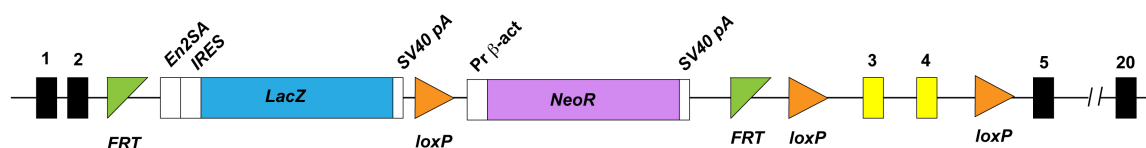
Para la replicación de los distintos vectores plasmídicos de interés se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , la cual presenta una serie de mutaciones que favorecen la

transformación bacteriana: supE44,  $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15), hsdR17, rec $\Delta$ 1, endA1, gyrA96, thi1, relA1.

### 3. Líneas celulares

#### 3.1. Células madre embrionarias de ratón con modificación en el gen *Pomt1*

Estas células fueron obtenidas comercialmente del consorcio internacional EUCOMM (*The European Conditional Mouse Mutagenesis Program*). Son células derivadas de la cepa de ratón C57BL/6N, que portan una modificación en el gen *Pomt1* (**Figura 6**).



**Figura 6: Esquema de la modificación en el gen *Pomt1* generada por EUCOMM.** FRT: sitio de reconocimiento por la recombinasa flipasa; *loxP*: sitio de reconocimiento por la recombinasa cre; *En2SA*: sitio aceptor de *splicing*; IRES: secuencia de reconocimiento interno del ribosoma; *LacZ*: gen de la  $\beta$  galactosidasa; *SV40 pA*: secuencia de poliadenilación del DNA del virus SV40; *Pr- $\beta$ -act*: promotor del gen de la  $\beta$ -actina humana; *NeoR*: gen de resistencia a neomicina. Los rectángulos (negros y amarillos) indican los exones de *Pomt1*. En amarillo los exones 3 y 4 de *Pomt1* que serían eliminados por la acción de la recombinasa cre.

#### 3.2 Líneas celulares inmortalizadas

En este trabajo de tesis doctoral se han utilizado las siguientes líneas celulares inmortalizadas:

- Línea celular C2C12: mioblastos de ratón.
- Línea celular HEK293T: células embrionarias de riñón humano.

### 4. Líneas de ratón

#### 4.1. Líneas consanguíneas (cepas)

- **Línea C57BL/6J:** cepa utilizada para el mantenimiento de la colonia de ratones en nuestro animalario. Obtenida de la casa comercial Charles River Laboratories.

#### 4.2 Líneas transgénicas

- **Ratones CD1-flipasa:** animales transgénicos con fondo genético CD1 que portan el transgén de la recombinasa flipasa para la eliminación de secuencias entre FRTs. Animales cedidos por el laboratorio de la Dra. Amparo Cano y provenientes del CNIO.
- **Línea *Crx-cre* (129.B6C3-Tg(*Crx-cre*)1<sup>Tfur</sup>):** animales transgénicos con fondo genético 129S6/SvEvTac que portan en su genoma el transgén de la recombinasa

cre dirigido por el promotor del gen *Crx*. Estos animales se utilizan para eliminar secuencias contenidas entre secuencias *loxP*. Generados por T. Furukawa (Nishida *et al.*, 2003) y obtenidos comercialmente del Centro RIKEN (Rikagaku Kenkyujo - Japón).

#### 4.3 Líneas generadas en esta tesis doctoral

A continuación se detallan las líneas de ratón generadas en este proyecto de tesis doctoral:

- **Línea *Pomt1* EUCOMM (*Pomt1*<sup>(EUCOMM)tm1a</sup>)**: línea de ratón generada desde los animales quimera obtenidos por la agregación de mórulas. Portan en su genoma la construcción EUCOMM al completo, siendo por ello los fundadores de la línea.
- **Línea *Pomt1* floxeadado (*Pomt1*<sup>(EUCOMM)tm1c</sup>)**: esta línea se origina tras el cruce de la línea *Pomt1*<sup>(EUCOMM)tm1a</sup> con ratones transgénicos CD1-flipasa. En su genoma, los exones 3 y 4 del gen *Pomt1* están flanqueados por secuencias de reconocimiento de la recombinasa cre (secuencias *loxP*). En este trabajo de tesis se utilizan animales heterocigotos (*Pomt1*<sup>+/-lox</sup>) u homocigotos (*Pomt1*<sup>lox/lox</sup>) para este cambio.
- **Línea *Pomt1* nulo (*Pomt1*<sup>(EUCOMM)tm1d</sup>)**: línea originada tras la eliminación de los exones 3 y 4 de *Pomt1* por la recombinasa cre. Para originar esta línea se cruzaron animales de la línea *Pomt1* floxeadado con animales transgénicos *Crx-cre*. En este trabajo se presentan animales heterocigotos (*Pomt1*<sup>+/-Crx-cre</sup>) u homocigotos (*Pomt1*<sup>-/-Crx-cre</sup>), siendo este último el modelo *knockout* condicional (*Pomt1* KOc).

La estrategia de generación de cada una de estas líneas o animales se detalla en las secciones posteriores de Métodos y Resultados.

## 5. Vectores plasmídicos

### 5.1. Vectores de clonación

Para la clonación de las diferentes secuencias de interés se han utilizado los siguientes vectores:

- **pcDNA3-Flag**: vector pcDNA3 (Invitrogen) al que se le ha añadido el epítipo FLAG (DYKDDDDK) entre las dianas de restricción *XhoI* y *XbaI* del sitio múltiple de clonación. Utilizado para la clonación de las secuencias codificantes de los genes murinos *Fktn* y *Fkrp*.
- **pBS-bluescript II SK(+)** (Fermentas): vector utilizado en la clonación de fragmentos de PCR para al análisis de mutaciones en los genes *Fktn* y *Fkrp*.

generadas por la tecnología de edición génica TALEN (*Transcription activator-like effector nucleases*).

## 5.2. Vectores recombinantes

A continuación se detallan vectores que se han utilizado y que ya portaban en su interior una secuencia de interés:

- **pTALEN-*Fktn*-Left (pTAL.CMV-T7.012638)**: vector comercial personalizado generado por Collectis BioResearch. Genera una proteína de fusión entre un dominio de unión al ADN y el dominio catalítico de la nucleasa FokI. La secuencia a la que se une pertenece al gen *Fktn* y es: 5' TAGACCA**AT**GAGTAGAA 3' (en negrita codón iniciador de *Fktn*). Utilizado en la generación de línea C2C12 *knockout* (KO) para *Fktn*.
- **pTALEN-*Fktn*-Right (pTAL.CMV-T7.012653)**: vector comercial personalizado generado por Collectis BioResearch. Genera una proteína de fusión entre un dominio de unión al ADN y el dominio catalítico de la nucleasa FokI. La secuencia a la que se une pertenece al gen *Fktn* y es: 5' TGT**T**AAAAGGGCCAAGA 3'. Utilizado en la generación de línea C2C12 KO para *Fktn*.
- **pTALEN-*Fkrp*-Left (pTAL.CMV.T7.v2.017628)**: vector comercial personalizado generado por Collectis BioResearch. Genera una proteína de fusión entre un dominio de unión al ADN y el dominio catalítico de la nucleasa FokI. La secuencia a la que se une pertenece al gen *Fkrp* y es: 5' TCTGACATCAGG**C**CCA 3' (en negrita la primera base del codón ATG iniciador). Utilizado en la generación de línea C2C12 KO para *Fkrp*.
- **pTALEN-*Fkrp*-Right (pTAL.CMV.T7.v2.017644)**: vector comercial personalizado generado por Collectis BioResearch. Genera una proteína de fusión entre un dominio de unión al ADN y el dominio catalítico de la nucleasa FokI. La secuencia a la que se une pertenece al gen *Fkrp* y es: 5' TGCCAGGGCAG**C**CCAGC 3'. Utilizado en la generación de línea C2C12 KO para *Fkrp*.

## 6. Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos de este trabajo de tesis han sido diseñados con el programa informático Oligo 6.8 para MacOS y sintetizados por Sigma-Aldrich.

### 6.1. Oligonucleótidos empleados en el diagnóstico genético

En la **Tabla 4** se detallan los cebadores utilizados para el diagnóstico mutacional del gen *EPG5*.

**Tabla 4. Cebadores utilizados para la secuenciación del exón 4 del gen *EPG5***

Núm.	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Localización
1	hEPG5-D	GGTTTTTGTGTATTGGTTTAAGTG	Intrón 3 <i>EPG5</i>
2	hEPG5-R	GCTGAAAAAGTTGAAGACCAAATGT	Intrón 4 <i>EPG5</i>

### 6.2. Oligonucleótidos empleados en la comprobación de la secuencia de la línea *Pomt1* EUCOMM

En la **Tabla 5** se detallan los cebadores empleados en la comprobación de la secuencia *Pomt1* de EUCOMM mediante PCR y posterior secuenciación de la misma.

**Tabla 5. Cebadores empleados en PCR y secuenciación de la construcción *Pomt1* EUCOMM**

Núm.	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Localización
1	EUC-1D	GTCATGCTCACTGGGCTTGGTAAAT	Intrón 2 <i>Pomt1</i>
2	EUC-1R	CTGCCTGCAAAGGGTCGCTACAGA	Sec. <i>IRES</i>
3	EUC-2D	AACAAATGCAAACGAGGCCAGAAAG	Sec. <i>En2SA</i>
4	EUC-2R	CCAGTTTGAGGGGACGACGACAGTA	$\beta$ -galactosidasa
5	EUC-3D	GCCCAGAAGGTACCCATTGTATG	Sec. <i>IRES</i>
6	EUC-3R	GATTAGCGCCGTGGCCTGATT	$\beta$ -galactosidasa
7	EUC-4D	GAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTT	$\beta$ -galactosidasa
8	EUC-4R	CTGCTGGTGTGTTTTCGTTCCGTCAG	$\beta$ -galactosidasa
9	EUC-5D	TCAGCGATTTCATGTTGCCACTC	$\beta$ -galactosidasa
10	EUC-5R	AGCAGTTGTTTTTATCGCCAATCC	$\beta$ -galactosidasa
11	EUC-6D	GAAAATGGTCTGCTGCTGCTGAACG	$\beta$ -galactosidasa
12	EUC-6R	CAGCGGTCAAAACAGGCGGCAGTA	$\beta$ -galactosidasa
13	EUC-7D	CAAATGGCGATTACCGTTGATGTTG	$\beta$ -galactosidasa
14	EUC-7R	GCGGGACATCCTAGGTGTGGAC	Sec. $\beta$ -actina
15	EUC-8D	TCCACCGCCGCTTCTATGAAA	Sec. plásmido EUCOMM
16	EUC-8R	TACCAAGAGCCAGGGATGGAATAGTT	Intrón 4 <i>Pomt1</i>

*IRES*, sec. de iniciación interna del ribosoma; *En2SA*, aceptor de *splicing* del gen murino *EN2*.

En la **Tabla 6** se detallan los cebadores empleados en LR-PCR para comprobar el correcto posicionamiento de la secuencia de *Pomt1* EUCOMM. Estas secuencias las facilita el propio Centro en su dominio web.

**Tabla 6. Cebadores utilizados para comprobar la correcta localización de la construcción *Pomt1* EUCOMM mediante LR-PCR.**

Núm.	Nombre	Secuencia (5' – 3')	Localización
1	GF3	CTGGAAGAGTACGGCTGGCGCACTGCTTC	Promotor <i>Pomt1</i>
2	GF4	CAGGCATAAGCCTCTTGCTACAGAACAGGC	Promotor <i>Pomt1</i>
3	LAR3	CACAACGGGTTCTTCTGTAGTCC	<i>En2SA</i>
4	RAF5	CACACCTCCCCCTGAACCTGAAAC	SV40 pA
5	GR3	GAGGCAAGGCTTGGCTACAAGGAGAGATGC	Intrón 11 <i>Pomt1</i>
6	GR4	GAGACTGAGGTCTCCGAGCAGACACTTG	Intrón 11 <i>Pomt1</i>

GF; *gene specific forward*, GR; *gene specific reverse*, LAR; *left arm reverse*, RAF; *right arm forward*; *En2SA*, aceptor de *splicing* del gen murino *EN2*; SV40 pA, sec. de poliadenilación del virus SV40.

### 6.3. Oligonucleótidos para el genotipado de animales

En la **Tabla 7** se detallan los cebadores empleados para el genotipado de las diferentes líneas de ratón.

**Tabla 7. Cebadores empleados en el genotipado de los animales**

Núm.	Nombre	Secuencia (5' – 3')	Localización
1	lacZ-D	CGTCGTTTTACAACGTCGTGAC	$\beta$ -galactosidasa
2	lacZ-R	TAACAACCCGTCGGATTCTC	$\beta$ -galactosidasa
3	LoxP3-D	CATTATACGAAGTTATGGTCTGAGC	Tercer sitio <i>loxP</i>
4	<i>Pomt1</i> -i4-R	ATAGATGTGGTGAGGGAGGGTTC	Intrón 4 <i>Pomt1</i>
5	FRT1-D	CATGCTCACTGGGCTTGGTAAAT	Intrón 2 <i>Pomt1</i>
6	LoxP2-R	CATGTGTGTAGTGTCCACCGAGG	Intrón 2 <i>Pomt1</i>
7	Crx Prom3-D	GCTGAAGCTGGAGGAATACCCTTTAGAC	Promotor <i>Crx</i>
8	LCB837	AGCATTGCTGTCACTTGGTC	Recombinasa re
9	oIMR0042	CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	<i>IL-2</i>
10	oIMR0043	GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATCC	<i>IL-2</i>
11	Flp-D	GACGCAAAAAGCAACAATTCTG	Sec. flipasa
12	Flp-R	AGATGCTTTTACCCTCACTTAG	Sec. flipasa

### 6.4. Oligonucleótidos empleados en la detección de la eliminación de los exones 3 y 4 de *Pomt1* en retina

La **Tabla 8** contiene se detallan los cebadores utilizados para detectar la pérdida de los exones 3 y 4 de *Pomt1* en la retina.

**Tabla 8. Cebadores empleados en la detección de la delección de los exones 3 y 4 de *Pomt1***

Núm.	Nombre	Secuencia (5' – 3')	Localización
1	<i>Pomt1</i> -i2-D	ACATCCATGCAGGGGAGAAAAAGAC	Intrón 2 <i>Pomt1</i>
2	<i>Pomt1</i> -i4-R	GTACCAAGAGCCAGGGATGGAATAG	Intrón 4 <i>Pomt1</i>

### 6.5. Oligonucleótidos empleados en RT-PCR y RT-PCR cuantitativa en *Pomt1* KOc

En la **Tabla 9** se detallan los cebadores empleados para valorar la expresión de *Pomt1* y genes endógenos en la retina de los ratones.



Tabla 9. Cebadores utilizados en RT-PCR y qRT-PCR en retina de ratones *Pomt1* KOc

Núm.	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Localización
1	E2-3-D	CGGGCTGTGGTTTTTCGATGA	Unión <u>exón 2</u> y <u>exón 3</u> <i>Pomt1</i>
2	E4-5-R	TTGCTACTGTACTCTGCTCCAAT	Unión <u>exón 4</u> y <u>exón 5</u> <i>Pomt1</i>
3	E2-5-D	CTCGGGCTGTGGTAGTACAGT	Unión <u>exón 2</u> y <u>exón 5</u> <i>Pomt1</i>
4	E5-R	CAATGGCAGCACCCTGGGAA	Exón 5 <i>Pomt1</i>
5	Gapdh-D	CTTCACCACCATGGAGAAGGC	Exón 3 <i>Gapdh</i>
6	Gapdh-R	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	Unión <u>exón 4</u> y <u>exón 5</u> <i>Gapdh</i>
7*	18S-D	CCAGTAAGTGCGGGTCATAAG	18S ratón
8*	18S-R	CCTCACTAAACCATCCAATCG	18S ratón
9*	Rplp0-D	ACTGGTCTAGGACCCGAGAAG	Exón 4 <i>Rplp0</i>
10*	Rplp0-R	TCCCACCTTGTCTCCAGTCT	Exón 5 <i>Rplp0</i>
11*	Actb-D	CTCTGGCTCCTAGCACCATGAAGA	Exón 5 <i>Actb</i>
12*	Actb-R	GTAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG	Exón 6 <i>Actb</i>
13*	B2m-D	CTGCTACGTAACACAGTTCCACCC	Exón2 <i>B2m</i>
14*	B2m-R	CATGATGCTTGATCACATGTCTCG	Exón 3 <i>B2m</i>
15*	Hprt1-D	GAGGAGTCCTGTTGATGTTGCCAG	Exón 9 <i>Hprt1</i>
16*	Hprt1-R	GGCTGGCCTATAGGCTCATAGTGC	Exón 9 <i>Hprt1</i>
17*	Hmbs-D	GAGTCTAGATGGCTCAGATAGCATGC	Exón 13 <i>Hmbs</i>
18*	Hmbs-R	CCTACAGACCAGTTAGCGCACATC	Exón 14 <i>Hmbs</i>

En los cebadores cuya secuencia forma parte de la unión de dos exones se señalan cada uno de ellos.

\* Oligonucleótidos obtenidos del Servicio de Genómica del IIB-Alberto Sols

## 6.6. Oligonucleótidos empleados en la búsqueda de mutantes TALEN en los genes *Fktn* y *Fkrp*

En la **Tabla 10** se detallan los cebadores utilizados para el rastreo de mutaciones generadas mediante tecnología TALEN en los genes *Fktn* y *Fkrp* de la línea celular C2C12.

Tabla 10. Cebadores utilizados en la búsqueda de mutantes TALEN para *Fktn* y *Fkrp*

Núm.	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Localización
1	TAL-Fktn-D	CCTTGTACTIONGCTATCCCCCTACCTCCAG	Intrón 1 <i>Fktn</i>
2	TAL-Fktn-R	AAACAGCATCAAGGGTAAGTTACACTACAATTC	Intrón 2 <i>Fktn</i>
3	TAL-Fkrp-D	TAAAACTGGGTGCTGGGGTTGTGCTTAAAC	Intrón 2 <i>Fkrp</i>
4	TAL-Fkrp-R	GCGTTGTCAAAAGCCTCAAATTCCCGAATC	Exón 3 <i>Fkrp</i>

## 6.7. Oligonucleótidos empleados en la clonación de fragmentos de PCR obtenidos de clones TALEN-*Fktn* y *Fkrp*

En la **Tabla 11** se detalla la información de los cebadores utilizados para la clonación de fragmentos de PCR en pBS-Bluescript, y que se obtuvieron de los clones TALEN-*Fktn* y TALEN-*Fkrp*.



**Tabla 11. Cebadores utilizados en la clonación de fragmentos de PCR de clones TALEN-  
Fktn o TALEN-Fkrp**

Núm.	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Localización
1	XbaI-TAL-Fktn-D	CCATCTAGACCTTGTACTTGCTATCCCCCTACC	Intrón 1 <i>Fktn</i>
2	EcoRI-TAL-Fktn-R	ATCGAATTCAAACAGCATCAAGGGTAAGTTACAC	Intrón 2 <i>Fktn</i>
3	XbaI-TAL-Fkrp-D	AGCTCTAGATAAACTGGGTGCTGGGGTTGT	Intrón 2 <i>Fkrp</i>
4	Sall-TAL-Fkrp-R	ACTGTCGACGCGTTGTCAAAGCCTCAAAT	Exón 3 <i>Fkrp</i>

Subrayado en la secuencia se marca la secuencia para la diana de restricción indicada en el nombre del cebador.

## 6.8. Oligonucleótidos empleados en qPCR en las líneas y clones C2C12 silvestre, KO-29, rC6 y KO-2

En la **Tabla 12** aparecen reflejados los cebadores utilizados para el estudio de qPCR tanto en el rescate de fenotipo como en el análisis transcriptómico.

**Tabla 12. Cebadores para el ensayo qPCR en las líneas celulares C2C12**

Núm.	Gen	Cebadores	Secuencia	Localización
1	<i>Fkrp</i>	mFkrp-D	CCACGGCGACATCATCCCTT	Exón 3
2		mFkrp-R	GTCGCCCTCCACCGCCTTCT	Exón 3
3	<i>Actn2</i>	mActn2-E1/2-D	<u>CAGCAGAGGAAGACGTT</u> CAC	Unión <u>exón 1</u> y 2
4		mActn2-E2/3-R	AGCCTTTCCCCTGAGATGAC <u>  </u>	Unión <u>exón 2</u> y 3
5	<i>Ankrd2</i>	mAnkrd2-E7/8-D	CCAAAGACAGAGAAGGGGACAGTG	Unión <u>exón 7</u> y 8
6		mAnkrd2-E8/9-R	GGTCTTTCCCGCCAGGTTCTTAG	Unión <u>exón 8</u> y 9
7	<i>Bmp4</i>	mBmp4-E3/4-D	<u>CATCACGAAGA</u> ACATCTGGAGACC	Unión <u>exón 3</u> y 4
8		mBmp4-E4-R	GGAGCTCTGCCGAGGAGATC3	Exón 4
9	<i>Csrp3</i>	mCsrp3-E4-D	GTCGGTATACGCTGCTGAGAAGG	Exón4
10		mCsrp3-E5-R	CTCCAGGCTCTTCCACAGATG	Exón 5
11	<i>Ckm</i>	mCkm-E5/6-D	<u>TGGCATCTGGCACA</u> ACGAC	Unión <u>exón 5</u> y 6
12		mCkm-E6/7-R	TCTCCTCAATCTTCTGCAGGC	Unión <u>exón 6</u> y 7
13	<i>Dmd</i>	mDmd-E61/62-D	<u>CACTTCCTTTCCACTT</u> CAGTTTCAG	Unión <u>exón 61</u> y 62
14		mDmd-E62/63-R	TTTGGGTCTCGTGGTTGATATAG	Unión <u>exón 62</u> y 63
15	<i>Id3</i>	mId3-E1/2-D	<u>TCTCCCGATCCAGACAGCT</u> GAGC	Unión <u>exón 1</u> y 2
16		mId3-E2-R	CCAGGACGACCGGGTCAGTG	Exón 2
17	<i>Mef2c</i>	mMef2c-E6-D	AGCAATCCTGTCAGCACACTG	Exón 6
18		mMef2c-E6/7-R	CCATCAGACCGCCTGTGTTAC	Unión <u>exón 6</u> y 7
19	<i>Nov</i>	mNov-E2/3-D	<u>CATTTGCATGGTTCCAGAGG</u>	Unión <u>exón 2</u> y 3
20		mNov-E3-R	CAGGTGCAGAAGTACTGACAGTTC	Exón 3
21	<i>Neb</i>	mNeb-E2/3-D	<u>CCCCGTTGCCTTGAGTTT</u> GTAG	Unión <u>exón 2</u> y 3
22		mNeb-E4/5-R	TGTAATTGTCTCTCCTGGCACCTC	Unión <u>exón 4</u> y 5
23	<i>Tnni2</i>	mTnni2-E1/2-D	<u>CAGCATCTAGGATCAGAGCTT</u> GAG	Unión <u>exón 1</u> y 2
24		mTnni2-E4/5-R	CATCACACTCTTCAGGTGCTGTC	Unión <u>exón 4</u> y 5
25	<i>Ttn</i>	mTtn-E15/16-D	<u>GTGAAGCCAAGGTAACAGAGACAG</u>	Unión <u>exón 15</u> y 16
26		mTtn-E16/17-R	GTTTTTTAAGCCCGAGACCAAG	Unión <u>exón 16</u> y 17

En los cebadores cuya secuencia forma parte de la unión de dos exones se señalan cada uno de ellos.

Los oligonucleótidos para genes endógenos de este ensayo son los mismos que los del apartado 6.5. de Materiales (oligonucleótidos 9-18, Tabla 9).

### 6.9. Oligonucleótidos empleados en la clonación de secuencias codificantes

En la **Tabla 13** se indican los diferentes cebadores utilizados en la clonación de secuencias para los genes de ratón *Fktn* y *Fkrp*.

**Tabla 13. Secuencia de los cebadores utilizados para la clonación de la secuencia codificante de *Fktn* y *Fkrp* murina y sus variantes mutantes**

Núm.	Nombre	Secuencia (5' - 3')
1	EcoRI-mFktn-D	CCAGAATTCACCATAGACCAATGAGTAGAATC
2	EcoRI-mFktn(-1)-D	CCAGAATTCACCATAGACCAATGAGTAGAATCAAG
3	EcoRI-mFktn(+1)-D	CCAGAATTCACCATAGACCAATGAGTAGA <b>CTG</b> ATCAATAAG
4	EcoRV-mFktn-R	TGGGATATCTGTACAACCTGGATAACCTCATC
5	EcoRI-mFkrp-D	CGTGAATTCGTCTGACATCAGGCCCATGCG
6	EcoRI-mFkrp(-1)-D	CGTGAATTCATCAGGCCCATGCGGG
7	EcoRI-mFkrp(+1)-D	CGTGAATTCATCAGGCCCATGCGACTATC
8	EcoRV-mFkrp-R	ACTGATATCCACCGCCTGTCAAGCTTAAGAGTGC

La secuencia subrayada corresponde al sitio de reconocimiento para la enzima de restricción EcoRI o EcoRV. En negrita se indica el ATG codón de inicio de la traducción. Y en rojo la secuencia del triplete correspondiente al aminoácido introducido por mutagénesis dirigida al usar este cebador.

### 6.10. Oligonucleótidos para secuenciación

En la **Tabla 14** se indican los diferentes cebadores utilizados para la secuenciación de las construcciones plasmídicas generadas en este trabajo.

**Tabla 14. Secuencia de los cebadores utilizados para la secuenciación de las construcciones plasmídicas**

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Plásmidos
CMV	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	pcDNA3-FLAG
BGH	TAGAAGGCACAGTCGAGG	pcDNA3-FLAG
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	pcDNA3-FLAG, pBS-bluescript II SK(+)
Sp6	GATTTAGGTGACACTATAG	pcDNA3-FLAG
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	pBS-bluescript II SK(+)

## 7. Anticuerpos primarios y secundarios

En la **Tabla 15** se recogen los anticuerpos primarios utilizados en este trabajo de tesis doctoral.

**Tabla 15. Anticuerpos primarios utilizados. Diluciones y origen**

Nombre	Tipo	Dilución utilizada			Origen
		WB	IF	CF	
I1H6	Monoclonal de ratón	1:500	1:25	1:100	Merck Millipore (05-593)
VIA-4	Monoclonal de ratón	1:200	1:25	-	Merck Millipore (05-298)

**Tabla 15. Anticuerpos primarios utilizados. Diluciones y origen (Cont.)**

Nombre	Tipo	Dilución utilizada			Origen
Anti- $\beta$ -DG	Monoclonal de ratón	1:1.000	1:50	-	Abcam (ab49515)
Anti-laminina	Policlonal de conejo	1:1.000	1:50	-	Sigma- Aldrich (L9393)
Anti-perlecana	Monoclonal de rata	-	1:100	-	Merck Millipore (MAB1948P)
Anti-biglicano	Monoclonal de ratón	-	1:100	-	Abcam (ab54855)
Anti-p62*	Policlonal de conejo	1:1.000	1:100	-	Enzo Life Science (BML-PW9860)
Anti-LC3B*	Policlonal de conejo	1:1.000	1:100	-	Sigma-Aldrich (L7543)
Anti-LAMP1*	Monoclonal de ratón	-	1:100	-	DHSB – Iowa Univ. (H4A3)
Anti-fukutina	Policlonal de conejo	1:500	-	-	ProteinTech (18276-1-AP)
Anti-FKRP	Policlonal de conejo	1:100	1:100	-	ProteinTech (16498-1-AP)
Anti-FLAG	Monoclonal de ratón	1:1.000	-	-	Pierce (MA1-91878)
Anti-GM130	Monoclonal de ratón	-	1:100	-	BD Biosciences (610823)
Anti-KDEL	Monoclonal de ratón	-	1:100	-	Abcam (ab12223)

Abreviaturas: WB, *western blot*; IF, inmunofluorescencia; CF, citometría de flujo.

\* Estos anticuerpos han sido cedidos por el Prof. José González Castaño, Facultad de Medicina, UAM.

En la **Tabla 16** se detallan los anticuerpos secundarios utilizados para la realización de esta tesis doctoral.

**Tabla 16. Anticuerpos secundarios utilizados. Diluciones y origen**

Nombre	Tipo	Marcaje	Dilución			Origen
			WB	IF	CF	
GAM-HRP	Policlonal de cabra contra IgG de ratón	Peroxidasa de rábano	1:5.000	-	-	Santa Cruz Biotech. (sc-2005)
GAR-HRP	Policlonal de cabra contra IgG de conejo	Peroxidasa de rábano	1:5.000	-	-	Santa Cruz Biotech. (sc-2030)
GAM-488	Policlonal de cabra contra IgG de ratón	Alexa Fluor® 488	-	1:500	1:500	Invitrogen (A-11029)
GAR-488	Policlonal de cabra contra IgG de conejo	Alexa Fluor® 488	-	1:500	-	Invitrogen (A-11034)
GARat-488	Policlonal de cabra contra IgG de rata	Alexa Fluor® 488	-	1:500	-	Invitrogen (A-11006)
GAM-647	Policlonal de cabra contra IgG de ratón	Alexa Fluor® 647	-	1:500	-	Invitrogen (A-21236)

Abreviaturas: WB, *western blot*; IF, inmunofluorescencia; CF, citometría de flujo; GAM, *goat anti mouse*; GAR, *goat anti rabbit*; GARat, *goat anti rat*; HRP, *horseradish peroxidase*.

## **8. Resina de afinidad**

Agarosa unida a aglutinina de germen de trigo (*Agarose bound wheat germ agglutinin* o WGA, en inglés). Esta resina de afinidad tiene unida la aglutinina de germen de trigo la cual tiene afinidad por grupos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y también por ácido siálico (Neu5Ac). Se utiliza en este trabajo para la purificación del  $\alpha$ -DG glicosilado.

## **9. Reactivos, soluciones y tampones**

Todos los reactivos utilizados en el presente trabajo fueron de grado analítico o de grado apto para las técnicas de Biología Molecular. La composición de las soluciones y tampones empleados en los distintos experimentos se incluye en la descripción de los métodos.

## **Métodos**

### **1. Diagnóstico de pacientes con sospecha de distroglicanopatía**

#### **1.1. Estudio de la expresión de proteínas**

##### **1.1.1. Inmunohistofluorescencia en tejido muscular**

El análisis de la expresión proteica por inmunohistofluorescencia se realizó sobre muestras de necropsia (paciente 1) o biopsia (paciente 2) muscular embebidas en el compuesto OCT (*Optimal cutting temperature compound*, Sakura Finetek USA Inc.). Los cortes realizados fueron de 10  $\mu$ m de grosor y se situaron sobre portaobjetos de adherencia cargados positivamente, y fueron realizados por los hospitales de origen.

El protocolo seguido para el ensayo de inmunohistofluorescencia en estas muestras fue el siguiente:

- Atemperar las muestras durante 5-10 min a temperatura ambiente.
- Eliminar el OCT sumergiendo las muestras en tampón fosfato salino (PBS: NaCl 136 mM, KCl 2,67 mM, fosfato sódico dibásico 10 mM y fosfato potásico monobásico 1,76 mM, pH 6,8-7) atemperado a 37 °C.
- Fijar las muestras por inmersión en una solución metanol:acetona (80:20) durante 15 min a -20 °C.
- Realizar 3 lavados de 5 min con agitación suave en PBS.
- Incubar las muestras con una solución de bloqueo que contenía: suero normal de cabra (NGS) al 5%, albumina de suero bovino (BSA) al 3% y Triton X-100 al 0,3%,

todo ello disuelto en PBS. Incubar durante una hora a temperatura ambiente situando las muestras en una cámara húmeda.

- Incubar con los anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo durante toda la noche en una cámara húmeda a 4 °C.
- Realizar 3 lavados de 5 min con agitación suave en PBS.
- Incubar con los anticuerpos secundarios correspondientes diluidos en solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
- Realizar un lavado de 5 min en agitación con PBS.
- Incubar las muestras con DAPI (4',6-Diamidino-2'-phenylindole, Roche) diluido 1:100 en PBS, durante diez minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
- Realizar 2 lavados de 5 min con agitación suave en PBS.
- Cubrir las muestras con cubreobjetos de tamaño apropiado, usando como solución de montaje *Prolong Gold* (Life Technologies).

### **1.1.2. Extracción de proteínas de tejido muscular**

Las muestras utilizadas para la extracción de proteínas son de nuevo provenientes de necropsia o biopsia muscular facilitadas por los hospitales.

Para la extracción de proteínas totales se utilizan 20-30 mg del tejido muscular. Éste se homogenizó utilizando un pistilo de vidrio en presencia de una solución de lisis (Tris HCl 50 mM, pH 8; NaCl 100 mM; y Triton X-100 al 1%) suplementada con una mezcla de inhibidores de proteasas sin EDTA (Roche). El homogenado se incubó durante 30 min en hielo mezclando cada 5 min en un vortex. Terminada la incubación, se centrifugó a 14.000 rpm durante 15 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante.

La medida de concentración de proteínas se realizó con el kit *Pierce™ BCA Protein Assay* (Pierce, Thermo Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **1.1.3. Purificación de proteínas glicosiladas por agarosa WGA**

Para el enriquecimiento en proteínas glicosiladas se utiliza la agarosa WGA y se siguió el siguiente protocolo:

- Equilibrar 50-100 µl de la agarosa WGA con un tampón de unión a lectinas (LBB) que contiene: Tris HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; MnCl<sub>2</sub>, 1 mM; y CaCl<sub>2</sub> 1 mM. El equilibrado se realizó mediante dos lavados con 500 µl de tampón LBB.
- Mezclar 500 µg de extracto proteico total (EPT) con 1 volumen de un tampón de unión a lectinas modificado (LBBM2x) que contiene: NaCl 200 mM, MnCl<sub>2</sub> 2 mM, y CaCl<sub>2</sub> 2 mM. Esta mezcla se denomina EPT-LBBM.

- Mezclar el EPT-LBBM con la agarosa WGA equilibrada, y llevar todo a un volumen final de 500 µl con tampón LBB.
- Incubar la mezcla toda la noche en una noria vertical a 4 °C.
- Centrifugar a 3.000 rpm durante 5 min a 4 °C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender la agarosa WGA en 500 µl de buffer LBB.
- Repetir los dos pasos anteriores una vez más.
- Eluir las proteínas incubando la agarosa WGA en tampón Laemmli (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; dodecilsulfato sódico (SDS) al 2%; β-mercaptoetanol al 5%; glicerol al 10% y azul de bromofenol al 0,001%) y en presencia de calor (100 °C durante 5 min en un termobloque).
- Centrifugar y recuperar el sobrenadante.

#### **1.1.4. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (western blot)**

Para los estudios de *western blot* (WB) se utilizó el sistema de electroforesis y transferencia de proteínas *Mini-PROTEAN® 3 cell* (Bio-Rad). El porcentaje de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1, Bio-Rad) utilizado en los geles es del 7,5% con un espesor de 1,5 mm. En estos geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) se cargó la muestra suplementada con tampón Laemmli y calentada durante 5 min a 100 °C, excepto si la muestra provenía de la elución del enriquecimiento con WGA, la cual ya está en este tampón Laemmli. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de entre 100-150 V en una solución de electroforesis Tris-glicina/SDS (Tris 25 mM, pH 8,3; glicina 125 mM y SDS al 0,01%) hasta la salida del frente iónico de migración. La transferencia se realizó a membranas de PVDF (previamente activadas 1 min en metanol puro) en una solución de transferencia (Tris-glicina más metanol al 20%) a un amperaje constante de 350 mA durante una hora en frío o toda la noche a 200 mA en cámara fría.

Se comprobó la transferencia de proteínas tiñendo las membranas con el colorante *Ponceau Red* (Sigma), el cual se eliminó de la membrana con lavados repetidos de agua destilada.

Las membranas se bloquearon en una solución de BSA al 3% en TBS-T (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6; y NaCl 150 mM suplementado con Tween-20 al 0,1%) durante una hora a temperatura ambiente. Esta solución de bloqueo se suplementa con CaCl<sub>2</sub> 1 mM y MgCl<sub>2</sub> 1 mM para los estudios de glicosilación del α-DG (anticuerpos IIH6 y VIA4).

La membrana así bloqueada se incubó con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C y con agitación orbital. Posteriormente se lavan las membranas con TBS-T y se incuban con el anticuerpo secundario diluido en

solución de bloqueo durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente se vuelven a lavar las membranas y se revela la señal utilizando el sistema ECL (*Enhance ChemiLuminescence*, Pierce, Thermo Scientific) y películas autorradiográficas.

### **1.2. Extracción de ADN genómico (ADNg) desde sangre**

La extracción de ADNg desde muestras de sangre se realizó utilizando el kit "*Masterpure complete DNA and RNA purification*" (Epicentre Biotechnologies), siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **1.3. Secuenciación masiva de exoma**

Para el paciente 1 de esta tesis doctoral se ha realizado un estudio de exoma, llevado a cabo por la empresa qGenomics ([www.qgenomics.com](http://www.qgenomics.com), Barcelona). Este estudio consistió en la captura y secuenciación masiva de los exones mediante el ensayo "*SureSelect Human All Exon Kit 51 Mb*" (Agilent) y el equipo Hiseq2000 (Illumina) con una profundidad de cobertura promedio superior a 30X. En el análisis bioinformático posterior se realizó una búsqueda de variantes de un único nucleótido y pequeñas inserciones o deleciones, usando como genoma de referencia la versión NCBI v37 (GRCh37) del genoma humano.

### **1.4. Amplificación y purificación del fragmento de PCR del exón 4 del gen *EPG5***

La amplificación del exón 4 del gen *EPG5* en el paciente 1 se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un volumen final de 25  $\mu$ l y con la siguiente composición: 100 ng de ADNg molde; 2,5  $\mu$ l de tampón de reacción (Tris-HCl 67 mM, pH 8,8;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  16 mM);  $\text{MgCl}_2$  1,5 mM; dNTPs totales 0,8 mM (Roche); 0,2  $\mu$ M de los cebadores apropiados y 0,625 U de ADN polimerasa termoestable Biotaq. La enzima, el tampón de reacción y la solución de  $\text{MgCl}_2$  se obtuvieron de la casa comercial Ecogen.

La PCR se realizó en un termociclador modelo PTC-100 (*Peltier Thermal Cycler*, M.J. Research). El tamaño del fragmento fue comprobado mediante electroforesis en gel de agarosa (*Agarose D1 Medium EEO*, Conda) al 1% en tampón tris borato-EDTA (TBE, Tris-borato 90 mM y EDTA 2 mM).

Para la purificación del fragmento de ADN amplificado se utilizó el kit comercial "*NucleoSpin Extract II*" (Macherey Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante para la extracción desde banda de gel.

Las condiciones de amplificación y cebadores de esta PCR para *EPG5* se detallan en la **Tabla 17**.

**Tabla 17. Condiciones de la PCR para la amplificación del exón 4 de *EPG5***

Cebadores <sup>‡</sup>	Condiciones	Amplicón
	5 min a 94 °C	
1-2	[20 s a 94 °C / 30 s a 62 °C / 40 s a 72 °C] x 35 cc	329 pb
	7 min a 72 °C	

<sup>‡</sup> La secuencia de los cebadores ya se indicó en la Tabla 4 en Materiales. cc, ciclos.

### 1.5. Secuenciación directa y análisis de secuencias

La secuenciación fue realizada por el Servicio de Genómica del IIB-Alberto Sols, mediante un secuenciador *ABI PRISM 3130x1 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). El análisis de las secuencias se realizó mediante los programas GeneJockey II y 4Peaks para MacOS.

## 2. Generación modelo *knockout* condicional para el gen *Pomt1* en retina

### 2.1. Mantenimiento de los animales de experimentación

Todos los animales utilizados en este trabajo de tesis doctoral han sido mantenidos en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” (IIB). Las condiciones de mantenimiento, estabulación, alimentación e iluminación han sido las contempladas en el RD53/2013. Los procedimientos realizados con estos animales han sido evaluados y aprobados por los diferentes comités de ética de las instituciones participantes de acuerdo a la legislación española y europea vigente. Así mismo, todas las personas que han trabajado con los animales se encuentran capacitadas con los cursos acreditados por el RD53/2013.

### 2.2. Purificación de ADN desde tejidos

La obtención de ADN de diferentes tejidos como cola o retina se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

- Partir aproximadamente de dos milímetros de cola o una cuarta parte de retina.
- Digerir el tejido en una solución Tris-HCl 20 mM, pH 8; NaCl 100 mM; EDTA 10 mM y SDS al 0,5%, suplementada con 100 µg de proteinasa K (Sigma-Aldrich) durante toda la noche a 55 °C, con una agitación de 1.000 rpm en un agitador *ThermoMixer 5436* (Eppendorf)
- Añadir al lisado 300 µl de una solución de NaCl 5M y mezclar por inversión 25-30 veces.
- Incubar la mezcla 10 min en hielo.
- Centrifugar a 13.000 rpm a 4 °C.

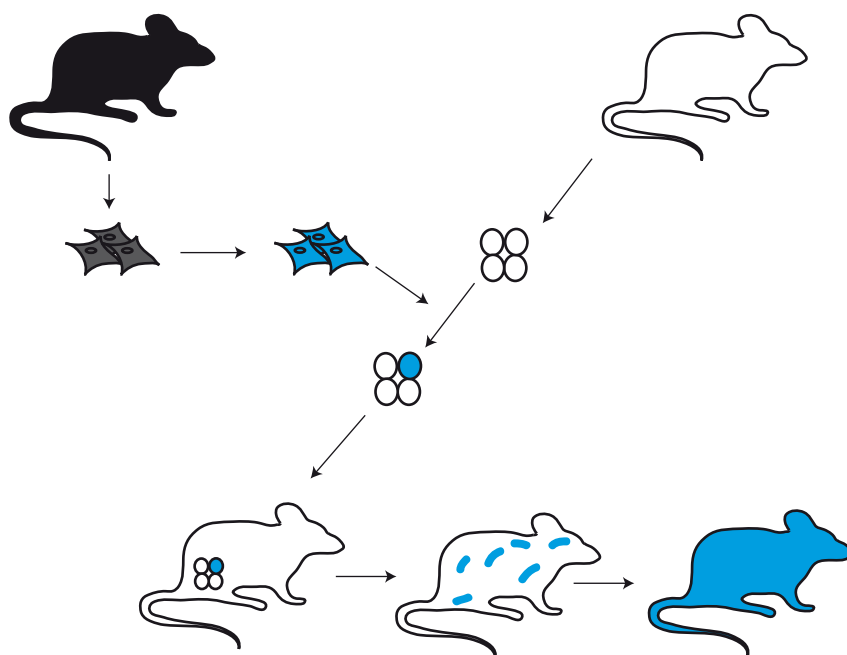


- Pasar el sobrenadante a un tubo de 1,5 ml, añadir 600 µl de isopropanol (Merck-Millipore) y mezclar por inversión 10-15 veces.
- Centrifugar a 13.000 rpm a 4 °C.
- Descartar el sobrenadante y lavar el sedimento con 400 µl de etanol diluido en agua destilada al 70%.
- Centrifugar a 13.000 rpm a 4 °C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el sedimento en 50-100 µl de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8 y EDTA 1 mM).

Las concentraciones de los ADNs obtenidos se miden en un *NanoDrop* (Thermo Scientific). La integridad del ADN se evalúa por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

### 2.3. Generación de animales quimera y de la línea *Pomt1* EUCOMM

La generación de los animales quimera fue llevada a cabo por el Servicio de Transgénesis Animal del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), a cargo de la Dra. Sagrario Ortega.



**Figura 7. Diagrama de la generación de animales quimera.** Las células embrionarias son obtenidas de una cepa C57BL/6N (en negro), y son modificadas ex vivo e in vitro (conversión negro a azul). Una vez seleccionadas se agregan con mórulas provenientes de un animal CD1 (en blanco). La mórula quimera (azul y blanca) se reimplanta en una hembra pseudogestante. De ella se obtienen animales quiméricos (blanco con rayas azules). Mediante un cruce con un animal CD1 silvestre se obtienen animales que portan en su genoma la modificación en *Pomt1* (animal azul).

En la **Figura 7** se resume el proceso, consistente en que la línea de células madre embrionarias modificadas en el gen *Pomt1* (Materiales 3.1.) es agregada con mórulas de animales del *stock* CD1. Esta mórula quimera se reimplanta en el útero de una hembra pseudogestante también CD1. El quimerismo de las crías obtenidas fue evaluado por pigmentación de la piel y por el color de los ojos. CD1 es una línea de ratón albino de ojos rojos, por lo que aquellas crías con otras coloraciones, tanto en piel como en ojos, son susceptibles de presentar el alelo modificado. Los animales quimera obtenidos se cruzaron de nuevo con ratones CD1 para comprobar la transmisión de la modificación genética. Las crías obtenidas de este nuevo cruce fueron genotipadas utilizando la PCR que se describe posteriormente en la sección 2.6 de Métodos (Tabla 20, Alelo EUComm).

#### 2.4. Análisis molecular de la secuencia genómica de *Pomt1* del EUComm en los animales

La comprobación de la secuencia se realizó sobre ADN de cola de los animales fundadores mediante ensayo de PCR. Éstas se realizaron en un volumen final y concentración de los componentes igual a las detalladas en el apartado 1.4. de Métodos. En alguno de los ensayos se añadió betaína (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 1 M para facilitar la amplificación de secuencias ricas en GC. Las condiciones de PCR (cebadores, temperaturas, ciclos y tiempos) se encuentran reflejadas en la **Tabla 18**.

**Tabla 18. Condiciones de PCR para la comprobación de la secuencia genómica de *Pomt1* EUComm en animales fundadores**

Cebadores <sup>‡</sup>	Condiciones	Amplicón	Betaína
1-2	5 min a 94 °C	1.617 pb	SI
	[20 s a 94 °C / 30 s a 62 °C / 40 s a 72 °C] x 35 cc		
	7 min a 72 °C		
3-4	5 min a 94 °C	1.377 pb	SI
	[20 s a 94 °C / 30 s a 63 °C / 40 s a 72 °C] x 35 cc		
	7 min a 72 °C		
5-6	5 min a 94 °C	1.543 pb	NO
	[30 s a 94 °C / 90 s a 68 °C] x 35 cc		
	7 min a 72 °C		
7-8	5 min a 94 °C	1.662 pb	NO
	[30 s a 94 °C / 90 s a 68 °C] x 35 cc		
	7 min a 72 °C		
9-10	5 min a 94 °C	1.666 pb	NO
	[20 s a 94 °C / 30 s a 62 °C / 40 s a 72 °C] x 35 cc		
	7 min a 72 °C		
11-12	5 min a 94 °C	1.742 pb	NO
	[20 s a 94 °C / 30 s a 62 °C / 40 s a 72 °C] x 35 cc		
	7 min a 72 °C		

**Tabla 18. Condiciones de PCR para la comprobación de la secuencia genómica de *Pomt1* EUCOMM en animales fundadores (Cont.)**

Cebadores <sup>‡</sup>	Condiciones	Amplicón	Betaína
13-14	5 min a 94 °C	941 pb	SI
	[20 s a 94 °C / 30 s a 60 °C / 40 s a 72 °C] x 35 cc		
15-16	7 min 72 °C	1.579 pb	NO
	5 min 94 °C		
	[20 s a 94 °C / 30 s a 60 °C / 40 s a 72 °C] x 35 cc		
	7 min a 72 °C		

<sup>‡</sup> La secuencia de los cebadores ya se indicó en la Tabla 5. cc, ciclos

La longitud de los fragmentos de PCR obtenidos son comprobados por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. La purificación de estos amplicones y la secuenciación se realizaron con la misma metodología mencionada en los apartados Métodos 1.4. y 1.5.

## 2.5. Análisis de la correcta construcción de la secuencia *Pomt1* del EUCOMM

Como en el apartado anterior, se utilizó el ADN obtenido de los animales fundadores para esta comprobación mediante un ensayo de PCR de largo alcance (*Long Range PCR*, en inglés (LR-PCR)). Se utilizó el kit “*Expand Long Template PCR System*” (Roche).

Estos ensayos se llevan a cabo en un volumen final de 15 µl y la concentración de los reactivos es la siguiente: 50 ng de ADN; 0,4 µM de cada cebador; 0,5 mM de cada dNTPs; DMSO al 1%; MgCl<sub>2</sub> 1,25 mM; trehalosa 66 mM; *Expand Long Template* tampón II 1X; 0,5 U *Expand Long Template Enzyme Mix* (Taq ADN polimerasa y Tgo ADN polimerasa). En este ensayo de PCR el programa es único para cada combinación de cebadores, y las condiciones utilizadas se muestran en la **Tabla 19**.

**Tabla 19. Condiciones de LR-PCR para la comprobación de la correcta construcción de la secuencia *Pomt1* del EUCOMM**

Cebadores <sup>‡</sup>	Condiciones	Amplicón
1-3	3 min a 94 °C	5.587 pb
2-3	[15 s a 93 °C / 30 s a 70 °C (-1 °C/ciclo) / 6 min a 68 °C]	4.759 pb
4-5	x 10 cc	
4-5	[15 s a 93 °C / 30 s a 60 °C / 6 min a 68 °C (+20 s/ciclo)]	7.466 pb
4-6	x 25 cc	7.753 pb
	7 min a 68 °C	

<sup>‡</sup> La secuencia de los cebadores ya se indicó en la Tabla 6. cc, ciclos

La longitud de los fragmentos de PCR obtenidos son comprobados por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%.

## 2.6. Genotipado de las diferentes líneas generadas

Para la detección de los diferentes alelos o transgenes presentes en las líneas de ratón se utilizaron los siguientes ensayos de PCR (**Tabla 20**). El volumen final y concentración de los reactivos es el mismo que el utilizado en el apartado 1.4. de Métodos y al igual que en el apartado anterior 2.4. en algunas de ellas se utiliza betaína.

**Tabla 20. Condiciones de PCR para el genotipado de las líneas de ratón**

Alelo	Cebadores <sup>‡</sup>	Condiciones	Amplicón	Betaína
EUCOMM	1-2	5 min a 94 °C [20 s a 94 °C / 30 s a 62 °C / 40 s a 72 °C] x 35 cc 7 min a 72 °C	345 pb	NO
	3-4	5 min a 94 °C [20 s a 94 °C / 30 s a 55 °C / 40 s a 72 °C] x 35 cc 7 min a 72 °C	314 pb	NO
Floxeado	5-6	5 min a 94 °C [20 s a 94 °C / 30 s a 60 °C / 40 s a 72 °C] x 35 cc 7 min a 72 °C	328 pb ( <i>wt</i> ) 431 pb ( <i>lox</i> )	SI
	7-8	5 min a 94 °C [20 s a 94 °C / 30 s a 60 °C / 60 s a 72 °C] x 35 cc 7 min a 72 °C	797 pb ( <i>Crx</i> ) 323 pb ( <i>Il-2</i> )	SI
Flipasa	11-12	5 min a 94 °C [20 s a 94 °C / 30 s a 53 °C / 40 s a 72 °C] x 35 cc 7 min a 72 °C	218 pb	NO

<sup>‡</sup> La secuencia de los cebadores ya se indicó en la Tabla 7. cc, ciclos; *lox*, alelo “floxeado”; *wt*, alelo silvestre; nulo, alelo nulo; *Crx*, alelo transgénico *Crx-cre*; *Il-2*, interleuquina 2.

## 2.7. Detección de la eliminación de los exones 3 y 4 del gen *Pomt1*

La detección del alelos nulos de *Pomt1* donde se han eliminado los exones 3 y 4 se realiza sobre ADN extraído de la retina mediante un ensayo de PCR en las mismas condiciones de concentración y volumen final que las indicadas en el apartado 1.4. de Métodos. Las condiciones de este ensayo se encuentran en la siguiente **Tabla 21**.

**Tabla 21. Condiciones de PCR para la detección de la eliminación de los exones 3 y 4 del gen *Pomt1***

Cebadores <sup>‡</sup>	Condiciones	Amplicón	Betaína
1-2	[20 s a 94 °C / 30 s a 60 °C / 60 s a 72 °C] x 35cc 7 min a 72 °C	1.475 pb (lox)	SI
		1.392 pb (wt)	
		545 pb (nulo)	

<sup>‡</sup> La secuencia de los cebadores ya se indicó en la Tabla 8; cc, ciclos.; *lox*, alelo “floreado”; *wt*, alelo silvestre; nulo, alelo nulo.

Los diferentes tamaños amplificados se distinguen mediante electroforesis en gel de agarosa MS-8 (Conda) al 1,5 %.

## 2.8. Extracción de ARN de retina

Para la extracción de ARN se utiliza como material de partida aproximadamente tres cuartas partes de una retina. La extracción se realiza utilizando el kit “*RNeasy Mini Kit*” (Qiagen) y siguiendo las instrucciones del fabricante para la extracción desde tejido.

## 2.9. Transcripción en reverso de ARN total de retina a ADN copia (RT)

La generación de ADN copia (ADNc) se realizó con el kit comercial “*qScript™ cDNA synthesis*” (Quanta Biosciences), utilizando 0,5-1 µg de ARN extraído de retina y siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 2.10. Estudio de la expresión génica por PCR (RT-PCR)

Para comprobar cualitativamente la expresión de las variantes de ARN transcrito silvestre o nulo del gen *Pomt1* se realizó un ensayo de PCR posterior a la retrotranscripción del ARN total (RT).

En este ensayo se utilizan 2-4 µl ADNc obtenido de la RT; 0,2 µM de cebadores de *Pomt1* específicos de cada variante y 0,04 µM de cebadores de *Gapdh*. El volumen final y la concentración del resto de componentes es la misma que en el apartado 1.4. de Métodos. Las condiciones de amplificación para cada una de las variantes de transcripción se detallan a continuación en la **Tabla 22**.

**Tabla 22. Condiciones de la RT-PCR para el ADNc de *Pomt1* KOc de retina**

ADNc	Cebadores <sup>‡</sup>	Condiciones	Amplicones
Silvestre	1-2	5 min a 94 °C	182 pb ( <i>Pomt1</i> )
	5-6	[20 s a 94 °C / 30 s a 56 °C / 60 s a 72 °C] x 35cc	238 pb ( <i>Gapdh</i> )
Nulo	3-4	5 min a 94 °C	136 pb ( <i>Pomt1</i> )
	5-6	7 min a 72 °C	238 pb ( <i>Gapdh</i> )

<sup>‡</sup> La secuencia de los cebadores ya se indicó en la Tabla 9. cc, ciclos

La longitud de los fragmentos amplificados se comprobó por electroforesis en gel de agarosa MS-8 (Conda) al 1,5 %.

### 2.11. Estudio de la expresión génica por PCR cuantitativa (qRT-PCR)

El estudio cuantitativo de la expresión de las diferentes variantes de *Pomt1* fue llevado a cabo por el Servicio de Genómica del IIB.

En este servicio, la transcripción en reverso del ARN total de retina se realizó utilizando el kit “*High Capacity cDNA Reverse Transcription*” (Applied Biosystems) según las instrucciones del fabricante. El ensayo de qPCR se realizó en el equipo *7900 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). La reacción se realiza en un volumen final de 10 µl usando 5 ng de cDNA y el kit “*Power SYBR Green PCR Master Mix*” (Applied Biosystems) y con las condiciones detalladas en la **Tabla 23**.

**Tabla 23. Condiciones de la RT-PCR para el ADNc de *Pomt1* KOc de retina**

ADNc	Cebadores <sup>‡</sup>	Condiciones	Amplicones
Silvestre	1-2		182 pb ( <i>Pomt1</i> )
Nulo	3-4		136 pb ( <i>Pomt1</i> )
<i>18S</i>	7-8		93 pb
<i>Rplp0</i>	9-10	10 min a 95 °C	123 pb.
<i>Actb</i>	11-12	[15 s a 95 °C / 1 min a 60 °C] x 35 cc	200 pb
<i>B2m</i>	13-14		241 pb
<i>Hprt1</i>	15-16		173 pb
<i>Hmbs</i>	17-18		250 pb

<sup>‡</sup> La secuencia de los cebadores ya se indicó en la Tabla 9. cc, ciclos.

Para este ensayo se analizaron 4 animales de cada genotipo: *Pomt1<sup>lox/lox</sup>*, *Pomt1<sup>+/-</sup>* y *Pomt1* KOc. La unidad experimental es el animal, por lo que se han analizado cuatro experimentos independientes de cada genotipo (12 animales en total). Se realizan 3 experimentos de qPCR con triplicados de cada gen, de manera que finalmente para cada gen tendremos 9 medidas en cada animal.

El análisis de la expresión se realiza analizando el ciclo umbral (Ct) y utilizando el método  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ . Para ello, el primer paso es seleccionar el gen endógeno para la normalización. Se analizan los valores de  $2^{(-Ct)}$  de los genes endógenos (*18S*, *Rplp0*, *Actb*, *B2m*, *Hprt1* y *Hmbs*) y se comparan entre los animales analizados. Se seleccionó al gen *Actb* como normalizador, ya que es el que no presenta diferencias significativas ni entre animales ni entre genotipos (interesante dato a tener en cuenta en estos estudios).

Se realiza entonces la media de cada experimento de qPCR para los ARNs de *Pomt1* y *Actb*. Los valores medios de cada resultado con *Pomt1* se normalizan con el valor medio al obtenido de *Actb* en cada experimento ( $\Delta Ct$ ). Para relativizar los valores se utiliza la media

de los  $\Delta Ct$  obtenidos de los animales *Pomt1*<sup>lox/lox</sup> en el análisis de expresión del ARN transcrito de *Pomt1* silvestre, y la media de los  $\Delta Ct$  obtenidos de *Pomt1* KOc al analizar el ARN transcrito de *Pomt1* nulo. Los valores así obtenidos  $\Delta\Delta Ct$  se transforman con la exponencial en base 2,  $[2^{(-\Delta\Delta Ct)}]$ .

El análisis estadístico realizado es un análisis de varianzas (ANOVA) de una vía donde se introducen los valores de  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  obtenidos. Se comprueba mediante el test de Shapiro-Wilk la normalidad de la distribución de las muestras, y mediante el test de Levene la igualdad de varianzas. Tanto los valores del ARN transcrito silvestre como nulo cumplen los criterios de normalidad y homocedasticidad, por lo que se puede aplicar el test *post hoc* de comparaciones múltiples de Bonferroni. Los programas informáticos utilizados para el estudio estadístico son GraphPad Prism 5 y SPSS 21.

### **2.12. Extracción de proteínas de retina**

El protocolo seguido para la extracción de proteínas desde las retinas de los animales es el siguiente:

- Obtención de las retinas: los animales se sacrifican por dislocación cervical y se extraen los ojos seccionando los músculos oculares y el nervio óptico. Se disecciona el ojo realizando un corte por debajo de la *ora serrata*. Se separa la cornea y se extrae el cristalino. Por último, se separa la retina del epitelio pigmentario.
- Extracción proteínas: para la extracción se utilizan las dos retinas de cada animal y se sigue el protocolo descrito en el apartado 1.1.2.

### **2.13. Enriquecimiento de proteínas glicosiladas en la retina**

Para el enriquecimiento en proteínas glicosiladas se reproduce el protocolo descrito en el apartado 1.1.3. de Métodos., con la excepción que la cantidad de EPT de retina utilizada es de 200-300  $\mu g$ .

### **2.14. Electroforesis desnaturizante y WB de proteínas de la retina**

Para los estudios de electroforesis y WB de proteínas de la retina se siguió el mismo protocolo que el detallado en el apartado 1.1.4. de Métodos.

### **2.15. Recubrimiento con laminina y detección (*laminin overlay*)**

Para el experimento de recubrimiento con laminina y su detección se reutilizaron las membranas en las que previamente se había detectado la señal de glicosilación del  $\alpha$ -DG (anticuerpo VIA4). Para la eliminación de los anticuerpos utilizados anteriormente se

incubó la membrana con un tampón de desenmascaramiento (*stripping*) compuesto por: Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,7; SDS al 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM; todo ello en agua desionizada. Esta incubación se realizó durante media hora a 50 °C y con agitación. Posteriormente se realizan de 5 a 6 lavados de 5 min con TBS-T.

Para comprobar la eliminación de los anticuerpos primarios de la membrana se incubaba ésta con el anticuerpo secundario y se revela la señal como en el apartado 1.1.4. de Métodos. Tras comprobar la ausencia de señal se realizaron de nuevo de 5 a 6 lavados de 5 min con TBS-T.

A continuación se incubaron las membranas con 1,25  $\mu$ g/ml de laminina (L2020, Sigma-Aldrich) diluida en un tampón de unión a laminina (LamBB: BSA al 3% en TBS-T, suplementado con  $\text{CaCl}_2$  1mM,  $\text{MgCl}_2$  1mM y  $\text{MnCl}_2$  1mM). Esta incubación se realizó durante toda la noche a 4 °C y con agitación orbital. Para la detección de la señal de la laminina se siguió el mismo protocolo que para el WB del apartado 1.1.4. de Métodos cambiando el tampón de bloqueo por tampón LamBB.

### **3.- Estudios de la función de *Fktn* y *Fkrp* en células C2C12**

#### **3.1. Cultivos celulares y diferenciación a miotubos**

La línea celular C2C12 de mioblastos se ha cultivado en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina. La línea se mantiene a una densidad inferior al 60% para prevenir su diferenciación. Para producir la diferenciación desde mioblasto a miotubo las células se dejan crecer hasta una confluencia del 80-90% y se cambia el anterior medio de cultivo por medio DMEM suplementado con suero de caballo (HS) al 2% y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina. Este medio de diferenciación se cambia cada 2-3 días.

La línea HEK293T se cultiva en medio DMEM suplementado con FBS al 10%, 100 U/ml de penicilina (Penilevel, Laboratorios ERN) y 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina (Laboratorios Reig Jofré).

#### **3.2. Generación de la línea C2C12 knockout para *Fktn* y *Fkrp* por tecnología TALEN**

##### **3.2.1. Transfección de vectores TALEN**

Para la transfección de los vectores recombinantes TALEN se utilizó el kit "*Amaya™ Cell Line Nucleofector™ Kit V*" (Lonza). Para ambos genes, se realizaron tres experimentos de nucleofección, utilizando en cada uno 5, 10 ó 15  $\mu$ g de los vectores TALEN (10, 20 ó 30  $\mu$ g totales). Se utilizaron un total de un millón de células por nucleofección. El programa utilizado para la nucleofección fue el recomendado por la casa comercial (programa B-032).



Se llevó, además, un control independiente de transfección, transfectando solo 2 µg del vector *GFP* del kit.

Se comprobó la fluorescencia de la GFP a 24 y 48 horas post-transfección. A las 48 h se recuperaron células nucleofectadas con los plásmidos TALEN para el estudio de digestión por enzimas de restricción en estos grupos de células transfectadas y para comenzar el aislamiento de clones individuales.

### **3.2.2. Corte con enzimas de restricción en células nucleofectadas**

La acción de la endonucleasa FokI causa roturas doble cadena del ADN que son reparados por el mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ), el cual puede introducir cambios en la secuencia. Para demostrar la presencia de estos cambios en las células nucleofectadas con los plásmidos TALEN se buscaron dianas de enzimas de restricción localizadas en la zona espaciadora, cuya pérdida significaría una mala reparación de esta secuencia. El corte con enzimas de restricción se realiza sobre el producto de la PCR que se detalla en el apartado posterior Métodos 3.3. Este producto se purifica siguiendo el protocolo del apartado 1.4. de Métodos.

Para las células transfectadas con TALEN-*Fktn* utilizamos la enzima HinfI. La digestión se lleva a cabo en 30 µl de volumen final que contienen: 200-300 ng de ADN purificado de la PCR, 20 U de HinfI (New England Biolabs) y buffer NEB4 (New England Biolabs). La mezcla se incubó a 37 °C toda la noche.

Para las células transfectadas con TALEN-*Fkrp* se utilizan las enzimas BslI y HphI. En ambos casos se utilizan entre 200-300 ng de ADN purificado de la PCR. La digestión con BslI se lleva a cabo en un volumen final de 25 µl que contiene: el fragmento de ADN de la PCR, 5 U de BslI (New England Biolabs) y tampón NEB3 (New England Biolabs); todo ello se incubó durante dos horas a 55 °C. La otra digestión se realiza también en un volumen final de 25 µl que contienen: ADN de la PCR, 2,5 U de HphI (New England Biolabs) y el tampón NEB4 (New England Biolabs); todo ello se incubó durante dos horas a 37 °C. Todas las digestiones se resuelven en electroforesis en geles de agarosa al 2%.

### **3.2.3. Aislamiento de clones individuales.**

Para generar clones individuales se realizó un protocolo de dilución límite: partiendo de una suspensión de células a  $10 \times 10^4$  células/ml se fueron realizando diluciones seriadas de un decimo hasta llegar a una suspensión de 10 células/ml. De esta suspensión se sembraron 100 µl ( $\approx 1$  célula) por pocillo en dos placas de 96 pocillos.

A las 24 horas se buscan al microscopio pocillos con una única célula y se señalan. Este cultivo se dejó expandir hasta una densidad del 50% aproximadamente, y en ese momento se levantaron y se sembraron en una placa de tamaño superior para seguir expandiendo los clones.

### 3.3. Caracterización de las mutaciones en clones *knockout* de *Fktn* y *Fkrp*

Para la caracterización de las mutaciones se diseñaron ensayos de PCR que amplifican la región donde actúan las TALEN. El volumen final y concentraciones de los reactivos son las mismas que las del apartado 1.4. de Métodos. Las condiciones y los cebadores utilizados se muestran en la **Tabla 24**.

**Tabla 24. Condiciones de PCR para la caracterización de mutaciones TALEN**

Nombre	Cebadores <sup>‡</sup>	Condiciones	Amplicón
TALEN-Fktn	1-2	5 min a 94 °C [30 s a 94 °C / 30 s a 62 °C / 90 s a 72 °C] x 35 cc 7 min a 72 °C	739 pb
TALEN-Fkrp	3-4	5 min a 94 °C [30 s a 94 °C / 30 s a 60 °C / 90 s a 72 °C] x 35 cc 7 min a 72 °C	654 pb

<sup>‡</sup> La secuencia de los cebadores ya se indicó en la Tabla 10.

El tamaño de los fragmentos analizados se realizó por electroforesis en gel agarosa al 1%. Las bandas se purifican y secuencian siguiendo los protocolos de los apartados 1.4. y 1.5. de Métodos.

Para obtener una mayor resolución a la hora de diferenciar pequeños cambios en el peso molecular, el producto de PCR se resolvió en geles de poliacrilamida al 5%. Las concentraciones de los reactivos utilizados para estos geles son: acrilamida-bisacrilamida (29:1) (Bio-Rad) al 5% y persulfato amónico al 0,063% en TBE 1x. Esta mezcla se desgasifica y, posteriormente, se añaden 3 µl de TEMED (Sigma) para producir la polimerización. La electroforesis se realizó a voltaje constante a 100 V hasta la salida del frente iónico.

#### 3.3.1. Clonación de los fragmentos de PCR de clones TALEN *Fktn* y *Fkrp*

Para caracterizar mejor las mutaciones presentes en los clones TALEN-*Fktn* y -*Fkrp* se repitieron las PCRs para la región de acción de la endonucleasa FokI con cebadores apropiados para su clonación en el plásmido pBS-Bluescript.

La amplificación de los fragmentos de PCR se realizó utilizando el kit de PCR de alta fidelidad “KAPA HiFi™ PCR Kit” (KAPA Biosystems). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl donde la mezcla de reacción contenía: 2,4 µl tampón Hi-Fi (para

*Fktn*) o tampón Hi-Fi GC rich (para *Fkrp*), 0,3 mM de cada dNTP (KAPA Biosystems), 0,3  $\mu$ M de los cebadores específicos, 0,5 U de DNA Polimerasa KAPA Hi-Fi y 50-100 ng del ADN de los clones. Las condiciones de esta amplificación se reflejan en la **Tabla 25**.

**Tabla 25. Condiciones de PCR para la caracterización de mutaciones TALEN**

Nombre	Cebadores <sup>‡</sup>	Condiciones	Amplicón
TALEN-Fktn	1-2	5 min a 94 °C [30 s a 94 °C / 30 s a 60 °C / 90 s a 72 °C] x 35 cc 7 min a 72°C	757 pb
TALEN-Fkrp	3-4	5 min a 94 °C [30 s a 94 °C / 30 s a 66 °C / 90 s a 72 °C] x 35 cc 7 min a 72°C	680 pb

<sup>‡</sup> La secuencia de los cebadores ya se indicó en la Tabla 11.

La purificación de los amplicones se realizó siguiendo el protocolo del apartado 1.4. de esta sección de Métodos. Para la clonación en el vector pBS-Bluescript se siguieron los protocolos estándar de clonación. Se utilizaron enzimas de restricción obtenidas de las casas comerciales Fermentas o New England Biolabs para la digestión de los fragmentos y vectores, fosfatasa alcalina (Promega) para la defosforilación de los vectores y la DNA ligasa de T4 (Roche) para la ligación de los fragmentos. Todos ellos se utilizaron siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

La transformación bacteriana se realizó siguiendo un protocolo estándar de choque térmico a 42 °C. A continuación se sembraron las bacterias transformadas en placas LB con el antibiótico de resistencia adecuado y se aislaron colonias bacterianas individuales.

De estas colonias se obtuvo ADN plasmídico a pequeña escala (*mini-prep*) utilizando el kit “NucleoSpin Plasmid” (Macherey-Nagel) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Este ADN plasmídico se secuenció en el Servicio de Genómica del IIB utilizándose los oligonucleótidos de la **Tabla 14**.

### **3.4. Estudio de la glicosilación del $\alpha$ -dystroglicano en los clones *knockout* de *Fktn* y *Fkrp***

#### **3.4.1. Análisis de la glicosilación por western blot**

Este análisis se realiza de la misma manera que en los apartados de Métodos 1.1.2., 1.1.3. y 1.1.4. con modificaciones. Para la extracción de proteínas (ver apartado 1.1.2.) se parte de placas p150 con células crecidas a confluencia y diferenciadas durante cuatro días. Para el enriquecimiento de glicoproteínas (apartado 1.1.3.) se utilizan 2 mg de EPT por cada 100  $\mu$ l de WGA. En el último apartado (1.1.4.) no se realiza ninguna modificación.

### **3.4.2. Análisis de la glicosilación por citometría de flujo**

Para el análisis de glicosilación por citometría de flujo se utilizaron células no diferenciadas y seguimos el siguiente protocolo:

- Lavar las placas dos veces con PBS.
- Levantar las células con PBS suplementado con EDTA 5 mM.
- Incubar hasta que se levanten a 37 °C.
- Neutralizar con igual volumen de medio de cultivo y recoger. Contar un millón de células.
- Pasar a tubo de 1,5 ml el volumen correspondiente.
- Centrifugar 2 min a 2.000 rpm a temperatura ambiente.
- Eliminar el medio por decantación.
- Añadir 1 ml de PBS frío y resuspender el sedimento con pipeta.
- Repetir el lavado con PBS.
- Resuspender el sedimento en 100 µl de tampón FACS (BSA al 5% y azida sódica al 0,02% en PBS) conteniendo el anticuerpo primario.
- Incubar 60 min a temperatura ambiente con agitación (1.400 rpm en *Thermomixer*, Eppendorf).
- Lavar dos veces con PBS frío (añadir, centrifugar y eliminar).
- Resuspender el sedimento en 100 µl de tampón FACS con el anticuerpo secundario.
- Incubar 20 min a temperatura ambiente con agitación constante y en oscuridad.
- Lavar dos veces con PBS.
- Fijar las células con paraformaldehído al 2% en PBS durante 10 min a temperatura ambiente.
- Lavar dos veces con PBS.
- Guardar las células marcadas y fijadas en 200 µl de tampón FACS a 4°C, hasta medir al día siguiente en el citómetro *FC500 MPL* (Beckman-Coulter), y justo antes pasar las muestras a una placa de 96 pocillos.

### **3.5. Rescate de fenotipo en los clones *knockout* de *Fktn* y *Fkrp***

#### **3.5.1. Generación de clones de sobreexpresión estable**

El rescate del fenotipo de clones *knockout* se realiza mediante la sobreexpresión de la construcción silvestre de *Fktn* o *Fkrp* y la generación de clones de sobreexpresión estable. Para la sobreexpresión utilizamos el protocolo de nucleofección mencionado en el apartado 3.2.1. de Métodos y utilizando 10 µg del plásmido pcDNA3-*Fktn*-wt-Flag o pcDNA3-*Fkrp*-wt-Flag. La generación de estos plásmidos se detalla en el apartado posterior 3.8. de Métodos.

Para la generación de clones de expresión estable de cada construcción seleccionamos en primer lugar aquellas células que han integrado en su genoma la construcción plasmídica. Para ello, 48 horas después de la nucleofección cambiamos el medio de cultivo por un medio de selección consistente en DMEM suplementado con FBS al 10% y 0,6-0,8 µg/ml de geneticina (G418, Santa Cruz Biotech), antibiótico de selección eucariota para el cual presenta resistencia el plásmido pcDNA3. Las células se mantienen 10 días en presencia de este medio, cambiando el mismo cada 2 ó 3 días.

Para la obtención de clones individuales que sobreexpresen cada una de las construcciones, partimos de estos cultivos seleccionados y repetimos el protocolo del apartado de Métodos 3.2.3. de generación de clones individuales.

### 3.5.2. Estudio de la expresión de *Fkrp* por qPCR

Para la obtención del ARN desde las células C2C12 se siguieron los pasos del apartado 2.8. de Métodos. Este análisis por qPCR es realizado por el Servicio de Genómica del IIB tal y como se describe en el apartado 2.11. y con las condiciones de la **Tabla 26**.

**Tabla 26. Condiciones de la qPCR para el estudio de expresión de *Fkrp***

Gen	Cebadores <sup>‡</sup>	Condiciones	Amplicón
<i>Fkrp</i>	1-2	10 min a 95 °C [15 s a 95 °C / 1 min a 60 °C] x 35 cc	148 pb

<sup>‡</sup> La secuencia de los cebadores ya se indicó en la Tabla 12. cc, ciclos.

Los genes endógenos utilizados para este experimento son los mismos que los utilizados en el apartado 2.11. de Métodos. El análisis de los datos obtenidos también se realiza mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Apartado 2.11.). En este estudio, la unidad experimental es el pase del cultivo, y las mediciones se realizan con células entre los pases 3 y 7. Los datos de células diferenciadas provienen de cultivos independientes a los no diferenciados, pero el ARN de estas últimas se recoge en el mismo día que se empieza a diferenciar la otra placa.

El número de ensayos qPCR realizados es tres, con un triplicado por cada ensayo (9 medidas en total para cada grupo experimental). Tras el estudio de los valores de los genes endógenos se selecciona el gen *18S* como gen normalizador al no presentar variaciones significativas entre las líneas celulares estudiadas (silvestre, *knockout* y rescatada). Para relativizar los datos se utiliza la media de los datos obtenidos en la línea C2C12 silvestre sin diferenciar.

El estudio estadístico realizado es un ANOVA de dos vías, siendo la variable dependiente el nivel de expresión del gen, y como variables independientes la diferenciación (no diferenciadas o diferenciadas) y el genotipo [C2C12 silvestre (wt), TALEN-*Fkrp* 29 (KO-29) y clon rescatado c6 (rC6)]. En todos los casos se cumplen los criterios de normalidad y homocedasticidad, aplicándose posteriormente el test de comparaciones múltiples de Bonferroni.

### ***3.5.3. Estudio de la expresión de *Fkrp* por WB y análisis de glicosilación del $\alpha$ -dystroglicano***

Este análisis se realiza de la misma manera que en los apartados de Métodos 1.1.2., 1.1.3. y 1.1.4. con modificaciones. En el estudio de mFKRP, la extracción de proteínas (apartado 1.1.2.) se realiza desde placas p100 con células crecidas a confluencia (no diferenciadas) y p100 con células diferenciadas durante cuatro días, pasando directamente a la electroforesis y WB (apartado 1.1.4.). En el análisis de glicosilación, la extracción de proteínas se realiza en ambos casos de placas p150 (no diferenciadas y diferenciadas), y también en ambos casos se realiza el enriquecimiento de glicoproteínas (apartado 1.1.3.) usando 2 mg de EPT por cada 100  $\mu$ l de WGA, y por último se realiza la detección por electroforesis/WB (apartado 1.1.4.).

### ***3.5.4. Estudio de la expresión proteica por inmunocitofluorescencia***

El protocolo que seguimos para la tinción por inmunocitofluorescencia es el siguiente:

- Sembrar 5.000-10.000 células sobre cristales de 12 mm de diámetro en una placa de 24 pocillos. Incubar durante 24 horas en medio de cultivo. Para la inmunocitofluorescencia en células diferenciadas se sembraron 5.000 células y a las 48 horas se cambió el medio de cultivo por medio de diferenciación, el cual se mantiene durante cuatro días.
- Lavar los pocillos con PBS dos veces.
- Fijar las células con una solución de paraformaldehído al 2% en PBS durante 30 min con agitación a temperatura ambiente.
- Lavar los cristales tres veces con PBS.
- Incubar los cristales con solución de bloqueo (NGS al 10% y Tritón X-100 al 0,03 % en PBS) durante una hora en agitación.

- Incubar los cristales con el anticuerpo primario en solución de incubación (BSA al 3%, NGS al 1% y Triton X-100 al 0,03% en PBS) durante toda la noche a 4 °C en una cámara húmeda.
- Lavar los cristales con PBS tres veces.
- Incubar con los anticuerpos secundarios correspondientes en solución de incubación durante una hora con agitación a temperatura ambiente y oscuridad.
- Lavar los cristales una vez.
- Incubar con DAPI 1:500 en PBS en agitación durante 10 min a temperatura ambiente.
- Lavar dos veces los cristales con PBS.
- Montar los cristales sobre portaobjetos con la solución *Prolong Gold*.

El resultado se observa en un microscopio de fluorescencia Nikon 90i y también mediante microscopios confocales Leica SP2 o Leica SP5.

### **3.6. Análisis glicoproteómico del $\alpha$ -dystroglicano**

Para el análisis glicoproteómico de los residuos del  $\alpha$ -DG endógeno de células C2C12 silvestres y de clones *knockout* TALEN-*Fktn* 63 y TALEN-*Fkrp* 29 se parte, al igual que en el apartado de Métodos 3.4.1., de 2 mg de EPT de células diferenciadas durante cuatro días que se enriquece con la lectina WGA. El total eluído de este enriquecimiento se carga en un gel de poliacrilamida con un gradiente del 5-20%. Para que sea más resolutive la separación de proteínas, la electroforesis se realiza en el aparato *SE600* de Amersham, donde los geles tienen un tamaño de 18x16 cm.

Para detectar las bandas en el gel, éste se tiñe con el siguiente protocolo:

- Prefijamos el gel durante 30 min en metanol al 50% y ácido acético al 10%.
- Se tiñe el gel durante 1 hora con azul de Coomassie al 0,25% diluido en metanol.
- Se destiñe el gel toda la noche en metanol al 50% y ácido acético al 10%.
- Se rehidrata el gel durante varias horas.

Una vez se observan claras las bandas, se procede a recortarlas sobre un transiluminador de luz visible. Las bandas congeladas fueron enviadas al laboratorio del Dr. Göran Larsson (Universidad de Gothenburg) para su análisis de glicopéptidos. El protocolo utilizado es el mismo que en la anterior colaboración con este grupo (Gomez Toledo *et al.*, 2012).

### 3.7. Estudio transcriptómico

#### 3.7.1. Análisis por RNAseq y selección de genes candidatos

Para el análisis masivo del transcriptoma total de las líneas C2C12 silvestre, C2C12 KO-63 (*Fktn*) y C2C12 KO-29 (*Fkrp*) se partió de dos placas p100 de cada línea diferenciada durante cuatro días. La extracción del ARN se llevó a cabo de la misma forma que en el apartado 2.8. Una vez extraído, la concentración de ARN se midió por *Nanodrop* y mediante el sistema fluorescente *Qubit 2.0* (Invitrogen). La integridad del ARN se analizó utilizando el bioanalizador *Agilent 2100* (Agilent), obteniéndose un valor de integridad (RIN) de entre 9-10.

Estas nueve muestras (tres por cada línea) fueron enviadas a la empresa Sistema Genómicos (Valencia) para el análisis transcriptómico. Las lecturas generadas se compararon frente a la última versión del genoma del ratón (*Mus musculus*) ofrecida por la base de datos Ensembl (versión 75). Tras ello se eliminaron las lecturas de baja calidad, y con las seleccionadas se procedió al ensamblaje, identificación y cuantificación.

Para la comparación entre muestras se utilizaron paquetes estadísticos del programa R, siendo seleccionados como diferencialmente expresados los genes con un valor de variación en la expresión inferior o superior a 2 veces (*Fold Change* < -2 o > +2), y con un valor estadístico de *pValue* ajustado mediante FDR (*False Discovery Rate*) de 0,05 o menor.

#### 3.7.2. Corroboración mediante qRT-PCR de los genes seleccionados del estudio transcriptómico

Al igual que en el apartado 2.8. de esta sección se utilizó el kit “*RNeasy Mini Kit*” para la obtención del ARN desde las células C2C12, siguiendo las instrucciones del fabricante. Y el estudio qPCR fue llevado a cabo por el Servicio de Genómica del IIB de la misma forma que en el apartado 2.11. de Métodos y con las condiciones de la **Tabla 27**.

**Tabla 27. Condiciones para el ensayo de qPCR de los genes seleccionados en el RNAseq**

Gen	Cebadores <sup>‡</sup>	Condiciones	Amplícón
<i>Actn2</i>	3	10 min a 95 °C [15 s a 95 °C / 1 min a 60 °C] x 35 cc	91 pb
	4		
<i>Ankrd2</i>	5		122 pb
	6		
<i>Bmp4</i>	7		99 pb
	8		
<i>Csrp3</i>	9		87 pb
	10		



**Tabla 27. Condiciones para el ensayo de qPCR de los genes seleccionados en el RNAseq**

Gen	Cebadores <sup>‡</sup>	Condiciones	Amplicón
<i>Ckm</i>	11	10 min a 95 °C [15 s a 95 °C / 1 min a 60 °C] x 35 cc	131 pb
	12		
<i>Dmd</i>	13		98 pb
	14		
<i>Id3</i>	15		115 pb
	16		
<i>Mef2c</i>	17		137 pb
	18		
<i>Neb</i>	19		130 pb
	20		
<i>Nov</i>	21		143 pb
	22		
<i>Tnni2</i>	23		88 pb
	24		
<i>Ttn</i>	25		89 pb
	26		

<sup>‡</sup> La secuencia de los cebadores ya se indicó en la Tabla 12. cc, ciclos.

El análisis de los datos obtenidos de estos estudios de qPCR se realiza exactamente igual que el realizado para el estudio qPCR de expresión de *Fkrp* (apartado 3.5.2.).

### 3.8. Análisis de la localización de FKRP y FKTN

#### 3.8.1. Obtención del ARN y generación del ADNc (RT)

Al igual que en el apartado 2.9. de esta sección se utilizó el kit “*RNeasy Mini Kit*” para la obtención del ARN desde las células C2C12, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La transcripción en reverso de ARN a ADNc se realizó de la misma forma que en el apartado 2.9. de Métodos.

#### 3.8.2. Clonación de la secuencias silvestre y mutantes de *Fktn* y *Fkrp*

La clonación de las diferentes secuencias de *Fktn* y *Fkrp* silvestres y mutantes se realiza de manera similar a la detallada en el apartado 3.3.1. de Métodos.

Para la amplificación se utilizaron los mismos volúmenes del kit de PCR de alta fidelidad “*KAPA HiFi™ PCR Kit*” (KAPA Biosystems) del apartado 3.3.1. variando únicamente el ADN molde utilizado. Para las construcciones de *Fktn* utilizamos ADNc obtenido de células C2C12 silvestre (construcciones *Fktn-wt* y *Fktn(+1)*) o del clon TALEN-*Fktn* 70 (construcción *Fktn(-1)*). En cambio, para las construcciones de *Fkrp* pudimos utilizar el ADNg directamente al encontrarse la secuencia codificante en un único exón, para *Fkrp-wt*

se obtuvo de células C2C12 silvestre, para la construcción *Fkrp*(+1) del clon TALEN-*Fkrp* 2 y para la construcción *Fkrp*(-1) del clon TALEN -*Fkrp* 66. La **Tabla 28** contiene las condiciones de reacción de cada una de las PCRs.

La metodología utilizada para la clonación de estos fragmentos es la misma que en el apartado 3.3.1. de Métodos. En esta clonación se utilizó el plásmido pcDNA3-FLAG como vector.

De las colonias bacterianas obtenidas se extrajo ADN plasmídico en pequeño volumen (mini-prep) para su secuenciación, pero también se extrajo en gran volumen (maxi-prep) para su posterior uso en transfecciones. Para esto último se utilizó el kit “PureYield™ Plasmid Maxiprep System” (Promega) siguiendo las indicaciones del fabricante

**Tabla 28. Condiciones de PCR para la amplificación de *Fktn* y *Fkrp* silvestres y mutantes**

Construcción	Cebadores <sup>‡</sup>	Condiciones	Amplicón
<i>Fktn</i> -wt	1-4	5 min a 94 °C [30 s a 94 °C / 30 s a 60 °C / 90 s a 72 °C] x 35 cc 7 min a 72 °C	1.413 pb
<i>Fktn</i> (-1)	2-4	5 min a 94 °C [30 s a 94 °C / 30 s a 64 °C / 90 s a 72 °C] x 35 cc 7 min a 72 °C	1.410 pb
<i>Fktn</i> (+1)	3-4	5 min a 94 °C [30 s a 94 °C / 30 s a 60 °C / 90 s a 72 °C] x 35 cc 7 min a 72 °C	1.416 pb
<i>Fkrp</i> -wt	5-8	5 min a 94 °C [30 s a 94 °C / 30 s a 68 °C / 90 s a 72 °C] x 35 cc 7 min a 72 °C	1.518 pb
<i>Fkrp</i> (-1)	6-8	5 min a 94 °C [20 s a 98 °C / 60 s a 72 °C] x 25 cc 7 min a 72 °C	1.515 pb
<i>Fkrp</i> (+1)	7-8	5 min a 94 °C [20 s a 98 °C / 15 s a 64 °C / 30 s a 72 °C] x 25 cc 7 min a 72 °C	1.509 pb

<sup>‡</sup> La secuencia de los cebadores ya se indicó en la Tabla 13. cc, ciclos. *Fktn*/*Fkrp*-wt, secuencia silvestre. *Fktn*/*Fktn*(-1), secuencia con 1 aa deleciónado. *Fktn*/*Fkrp*(+1), secuencia con 1 aa insertado.

### 3.8.3. Transfección de las construcciones plasmídicas

El protocolo de transfección en células HEK293T se basó en el método del cloruro cálcico. Se preparó una mezcla cuya concentración final fue CaCl<sub>2</sub> 0,12 M y 1 µg de ADN plasmídico en tampón salino HEPES (HBS) (NaCl 0,28 M, HEPES 0,05 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 mM, pH 7,05-7,1 en agua desionizada). Se prepara primero la mezcla ADN-CaCl<sub>2</sub>, y sobre ella se añadió gota a gota el tampón HBS. La mezcla se incubó 20 min a temperatura ambiente y se añadió sobre el cultivo gota a gota.

El protocolo de nucleofección en células C2C12 usado es el mismo que se detalla en el apartado 3.2.1. de Métodos, utilizándose en este caso 10 µg de cada construcción.

#### ***3.8.4. Análisis de la expresión mediante inmunocitofluorescencia***

El estudio de localización de la proteína mFKRP mediante ICF en células C2C12 se realizó 48 horas después de la nucleofección de las construcciones y de la misma forma que se ha descrito en el apartado 3.5.4. de Métodos.

## *Resultados*

## **1. Estudio genético-molecular de pacientes con sospecha de distroglicanopatía**

En este capítulo se describen los resultados obtenidos del estudio genético y molecular realizado a dos pacientes con sospecha de distroglicanopatía.

### **1.1. Análisis de la glicosilación y expresión del distroglicano**

#### **1.1.1. Estudios de inmunohistofluorescencia**

Para evaluar el estado del DG en ambos pacientes se utilizaron criosecciones de necropsia o biopsia muscular, las cuales se incubaron con los anticuerpos correspondientes: para el estudio de la glicosilación del  $\alpha$ -DG se utilizaron los anticuerpos IIH6 y VIA4; mientras que el estudio de la expresión completa del DG se evaluó mediante el anticuerpo contra  $\beta$ -DG.

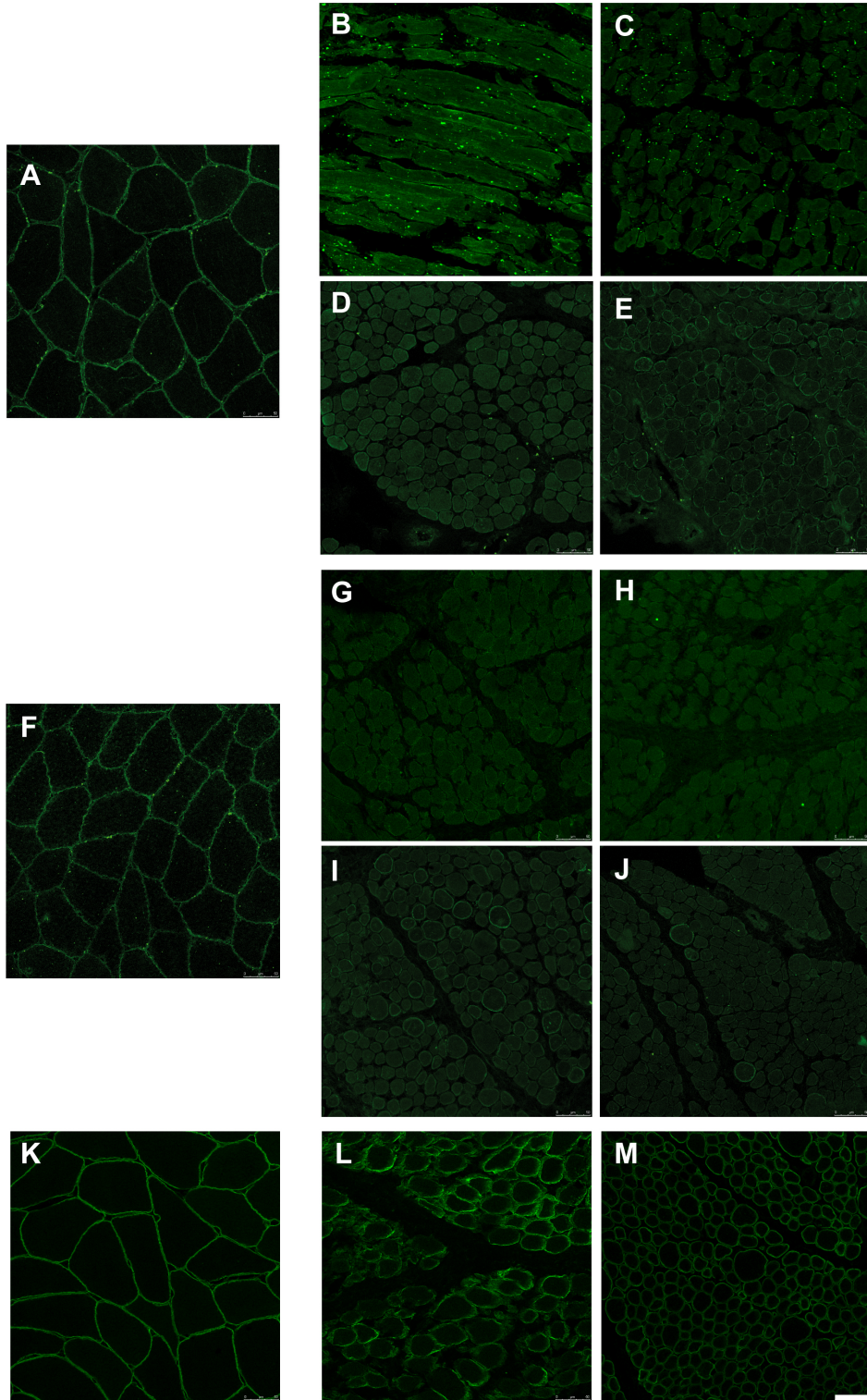
En todos ellos se utilizó como control una biopsia muscular de un individuo adulto no afectado. El patrón de glicosilación en este control presentó la señal esperada alrededor de la fibra muscular, tanto para IIH6 (**Figura 8A**) como para VIA4 (**Figura 8F**). Este mismo patrón se repitió para el anticuerpo contra  $\beta$ -DG (**Figura 8K**).

El estudio realizado en el paciente 1 no mostró señal para la glicosilación del  $\alpha$ -DG. Solamente fueron detectables algunos acúmulos en forma de punto en el interior de las fibras cuando se utilizó el anticuerpo IIH6 (**Figuras 8B y C**). La falta de señal también se observó usando el anticuerpo VIA4 (**Figuras 8G y H**), aunque en este caso no se observaron los acúmulos anteriores. La tinción contra  $\beta$ -DG no mostró diferencias con el control no afectado (**Figura 8L**).

Para el paciente 2, la tinción con el anticuerpo IIH6 no fue homogénea en los cortes estudiados, encontrándose en un mismo corte regiones sin tinción alrededor de las fibras (**Figura 8D**) junto a otras regiones que mantenían la tinción (**Figura 8E**). Esta falta de homogeneidad también se comprobó con el anticuerpo VIA4 (**Figuras 8I y J**), aunque en este caso el número de fibras con marcaje variaba dentro de las mismas regiones. Al igual que en el paciente anterior, la tinción con el anticuerpo contra  $\beta$ -DG no mostró diferencias con respecto al control (**Figura 8M**).

#### **1.1.2. Estudios por western blot**

Para confirmar los resultados obtenidos por inmunohistofluorescencia (IHF) se realizaron estudios de expresión de la proteína mediante la técnica de *western blot* (WB). La glicosilación del  $\alpha$ -DG se comprobó en extractos musculares enriquecidos por WGA, mientras que la expresión de  $\beta$ -DG se hizo directamente en el extracto proteico muscular.

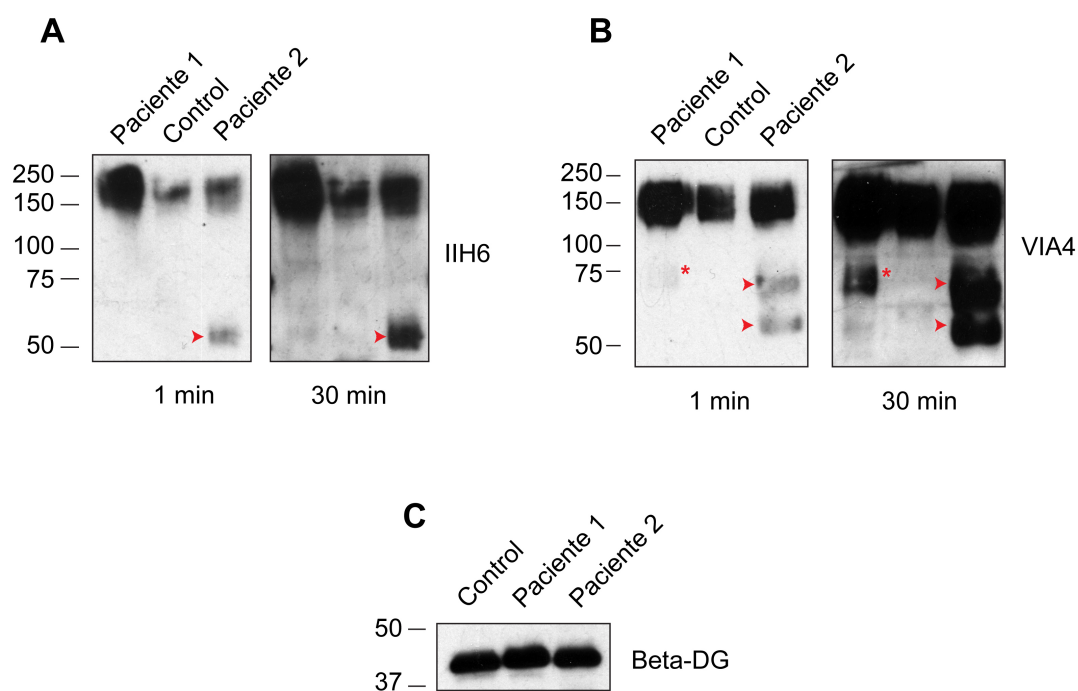


**Figura 8. Estudios de inmunohistofluorescencia para DG en los pacientes 1 y 2.** Control sano (A, F y K), paciente 1 (B, C, G, H y L) y paciente 2 (D, E, I, J y M). Anticuerpos: IIH6 (A-E), VIA4 (F-J) y  $\beta$ -DG (K-M). Los controles mostraron la señal alrededor de la fibra para los tres anticuerpos (A, F y G). En el paciente 1 la señal de IIH6 se encontró acumulada en el interior de las fibras (B y C), mientras que con VIA4 no se detectó señal alguna (G y H). En el paciente 2, utilizando IIH6 se detectaron tanto regiones sin tinción (D) como regiones que mantenían la tinción (E). Con VIA4 también se detectaron fibras marcadas y no marcadas (I y J). Ambos pacientes mantuvieron la misma señal que el control para el anticuerpo contra  $\beta$ -DG (L y M). Aumento 40x y escala 50  $\mu$ m (A-M).

Los resultados obtenidos para el anticuerpo IIH6 no mostraron diferencias entre el paciente 1 y el control sano, presentando ambos el  $\alpha$ -DG correctamente glicosilado, detectable a un peso molecular entre 150-250 kDa (**Figura 9A**). Por su parte, en el paciente 2 se detectaron dos bandas de glicosilación, la primera correspondiente con el  $\alpha$ -DG correctamente glicosilado, a la misma altura que el control sano, y otra banda de menor peso molecular (punta de flecha, **Figura 9A**).

Para el anticuerpo VIA4, sí se observaron diferencias entre ambos pacientes y el control sano, el cual mantenía el mismo patrón que con el anticuerpo IIH6 (**Figura 9B**). En el paciente 1 se detectó la señal de alto peso molecular, pero también una señal de mucho más tenue a la altura de 75 kDa visible a mayor exposición (asterisco, **Figura 9B**). Por su parte, en el paciente 2 se detectaron diferentes bandas de glicosilación, la primera a la misma altura que el control y otras dos bandas de intensidad parecida entre ellas, ambas entre 75 y 50 kDa (puntas de flecha, **Figura 9B**).

Por último, al igual que en la IHF, la detección con el anticuerpo contra  $\beta$ -DG no mostró diferencias entre el control y los pacientes (**Figura 9C**).



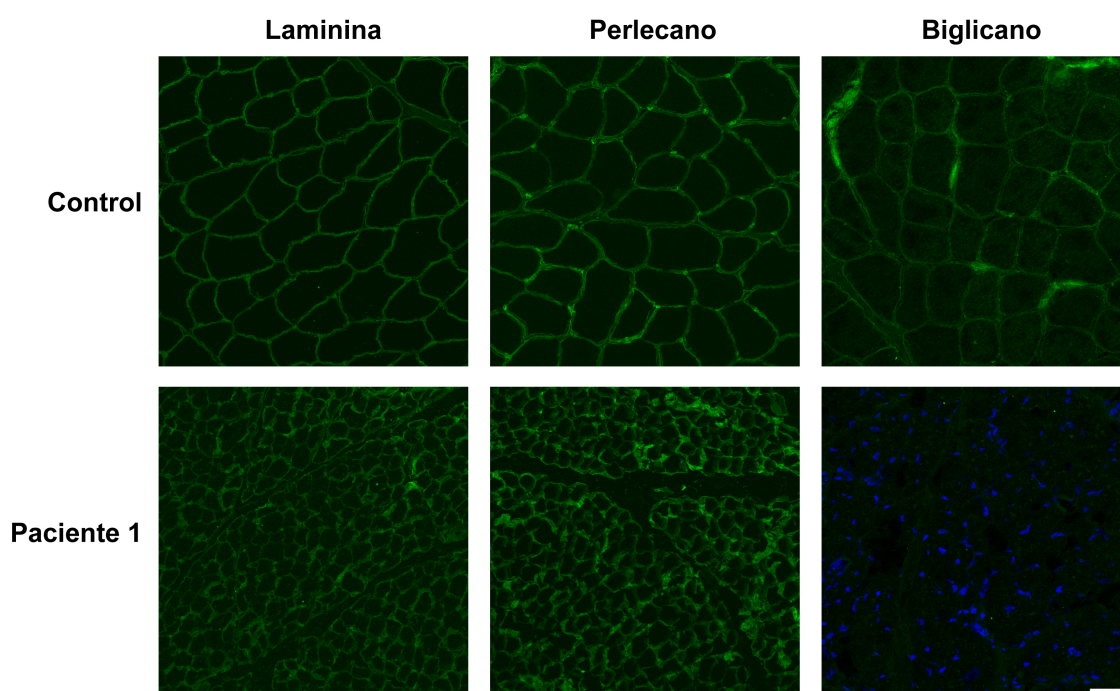
**Figura 9. Estudios de western blot para DG en los pacientes 1 y 2.** (A) Western blot con el anticuerpo IIH6 con muestras enriquecidas por WGA. Se observa en todas las muestras una banda a la misma altura que el control (150-250 kDa), y solo en el paciente 2 se aprecia una banda de peso molecular próximo a 50 kDa (punta de flecha). (B) Western blot con el anticuerpo VIA4 en muestras enriquecidas por WGA. Todas las muestras presentan glicosilación a la altura del control. El paciente 1 presenta una banda a la altura de 75 kDa (asterisco). El paciente 2 también presenta dos bandas adicionales de menor peso molecular, entre 75 y 50 kDa (puntas de flecha). (C) Western blot para  $\beta$ -DG en extractos proteicos musculares. No se aprecian diferencias entre el control y los pacientes.



### 1.1.3. Análisis de las proteínas de la matriz extracelular en el paciente 1

Paralelamente a los estudios sobre el DG decidimos estudiar el estado de las proteínas de la MEC que interaccionan con el  $\alpha$ -DG, bien con sus residuos glicosílicos (laminina y perlecano) o bien con su estructura proteica (biglicano).

Estos análisis revelaron que en el paciente 1 la laminina y el perlecano mantenían su expresión normal alrededor de la fibra muscular, como en el caso del control (**Figura 10**). Sin embargo, el biglicano no estaba presente en la MEC del paciente 1 (**Figura 10**).



**Figura 10. Inmunohistofluorescencias de proteínas de la MEC en tejido muscular del paciente 1.** Los paneles superiores muestran la tinción en tejido muscular control para la laminina, el perlecano y el biglicano, y en todos los casos la señal obtenida es la esperada alrededor de la fibra muscular. Los paneles inferiores muestran los resultados del paciente 1, en los cuales se observa que la laminina y el perlecano mantienen una señal alrededor de la fibra similar al control, mientras que para el biglicano no se ha detectado señal en este paciente. Aumento 40x, escala 50  $\mu$ m.

Estos estudios no se pudieron realizar en el paciente 2 al no disponer de suficientes crio secciones de tejido muscular.

### 1.2. Búsqueda de genes causantes de enfermedad

Los resultados obtenidos de los análisis anteriores en ambos pacientes nos llevaron a pensar en un posible problema en la glicosilación o expresión del  $\alpha$ -DG, por ello continuamos con el siguiente paso en el diagnóstico, consistente en la búsqueda de genes causantes de estas patologías. Ambos pacientes han sido analizados utilizando la tecnología



de secuenciación de nueva generación basada en el análisis masivo de la secuencia de los exones de cada individuo (captura de exoma).

### 1.2.1. Análisis masivo de exoma

Para el paciente 1, el análisis de exoma fue solicitado por nuestro laboratorio a la empresa qGenomics (Barcelona). En primer lugar se analizó una serie de genes candidatos para distroglicanopatías (**Anexo I, Tabla 36**) Las mutaciones encontradas en los genes *DPM2*, *POMT1* y *FKTN* se hallaban en heterocigosis (**Tabla 29**) por lo que fueron descartadas como implicadas en el proceso al ser recesivas estas patologías. En cambio, las mutaciones en *DAG1* y *POMGNT1* se encontraron en homocigosis (**Tabla 29**).

**Tabla 29. Mutaciones en el paciente 1 en genes candidatos de distroglicanopatía**

Gen	Mutación		Estado	dbSNP
	ADN codificante	Proteína		
<i>DAG1</i>	c.41C>G (NM_001165928.3)	p.Ser14Trp (NP_001159400.2)	Homocigosis	rs2131107
<i>DPM2</i>	c.227C>G (NM_003863)	p.Thr76Ser (NP_003854.1)	Heterocigosis	rs7997
<i>POMT1</i>	c.913G>A (NM_001136113)	p.Val305Ile (NP_001129585)	Heterocigosis	rs4740164
<i>POMGNT1</i>	c.1801A>G (NM_001290129)	p.Met601Val (NP_001277058.1)	Homocigosis	rs6659553
<i>FKTN</i>	c.608G>A (NM_006731.2)	p.Arg203Gln (NP_006722.2)	Heterocigosis	rs34787999

Para descartar que estas mutaciones en *DAG1* y *POMGNT1* no fueran polimorfismos presentes en la población humana, se realizó una búsqueda en la bases de datos de variantes *ExAc* y *1000 Genomes*. También se realizó una predicción de patogenicidad de cada mutación, utilizando el programa de predicción *PolyPhen2*. Ambas mutaciones tienen una frecuencia muy elevada en la población y no se predice que sean patogénicas (**Tabla 30**).

**Tabla 30. Estudio de frecuencias poblacionales y predicción de patogenicidad de las mutaciones en genes candidatos de distroglicanopatías**

Gen	Frecuencia en la población (%)		Predicción PolyPhen2
	1000 Genomes	ExAc	
<i>DAG1</i>	96,59%	99,23%	Benigna
<i>POMGNT1</i>	94,25%	98,38%	Benigna

Después de descartar los genes candidatos de distroglicanopatías se buscaron cambios patogénicos en otros genes y se analizó su patología asociada, en el caso de estar

descrita. Entre estos resultados (**Anexo I, Tabla 37**) se encontró una mutación en homocigosis en el gen *EPG5* (*ectopic p-granules 5*), este cambio generaba un codón de parada prematuro (**Tabla 31**).

El gen *EPG5* está descrito como causante del síndrome de Vici (OMIM 242840), una enfermedad rara de herencia recesiva, que cursa con importantes problemas musculares y del sistema nervioso y relacionada con problemas en el proceso de la autofagia. Varios de los síntomas descritos para este síndrome concuerdan con los presentados por este paciente (Materiales 1.1.).

**Tabla 31. Mutación en el gen *EPG5* del paciente 1 encontrada mediante exoma**

Gen	Mutación		Estado	dbSNP
	ADN codificante	Proteína		
<i>EPG5</i>	c.1351C>T (NM_020964)	p.Gln451Ter (NP_066015)	Homocigosis	rs775499286

Al igual que con los genes de distroglicanopatía, se comprobó la frecuencia poblacional de esta mutación y se realizó la predicción de patogenicidad de la misma. Esta mutación tiene una frecuencia muy baja en la población y se predice como patogénica, al generar un codón de parada prematuro (**Tabla 32**).

**Tabla 32. Frecuencia poblacional y análisis de patogenicidad de la mutación en *EPG5***

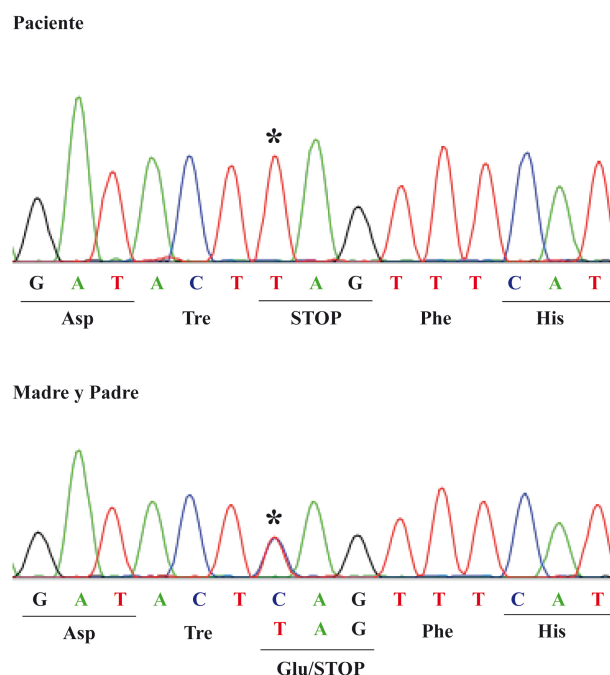
Gen mutado	Frecuencia en la población		Predicción PolyPhen2
	1000 Genomes	ExAc	
<i>EPG5</i>	-	8,35e-06	Probablemente dañina

En el caso del paciente 2, el análisis masivo de exoma fue encargado a la empresa NIMGenetics por el propio hospital de referencia, así como por la familia del paciente. En los resultados que nos fueron facilitados de estos estudios no se encontraron mutaciones en ninguno de los genes causantes de distroglicanopatías descritos hasta la fecha. Así mismo, tampoco se describieron mutaciones que se pudieran relacionar con la clínica que presentaba el paciente 2 (Materiales 1.2.), ni con los resultados obtenidos del análisis de glicosilación del  $\alpha$ -DG. Por lo tanto, todavía es desconocido el gen causante de la patología del paciente 2.

### 1.2.2. Análisis por secuenciación directa del gen *EPG5*

Para comprobar que el resultado obtenido por la secuenciación de exoma en el paciente 1 es correcto, se diseñó un ensayo de PCR para amplificar y secuenciar la zona de

la mutación. El resultado obtenido corrobora la mutación observada por exoma de la aparición de un codón de terminación en homocigosis (panel superior, **Figura 11**). El análisis en ambos parentales determinó que son portadores en heterocigosis de la misma mutación (panel inferior, **Figura 11**).



**Figura 11: Secuenciación de la mutación en *EPG5* en el paciente y los parentales.** En esta imagen se muestra la región donde se localiza la mutación en el gen *EPG5*. En el paciente se puede observar la aparición de un único pico para timina (T, asterisco), el cual genera un codón de terminación de la traducción (STOP). En la parte inferior se muestra la secuenciación en ambos parentales de esta misma región, presentando en este mismo punto un pico doble citidina/timina (C/T, asterisco), que genera en uno de los alelos glutamina (Glu) y el otro un codón de terminación (STOP).

### 1.3. Estudio de proteínas de autofagia

Ambos pacientes presentaban una alteración en el proceso de la autofagia. En el caso del paciente 1, nos basamos para esta afirmación en que el gen *EPG5* y su producto proteico se han relacionado con este proceso (Tian *et al.*, 2010), mientras que para el paciente 2 nos basamos en diferentes pruebas inmunohistoquímicas, realizadas con anterioridad en el hospital de origen, que determinaron la presencia de vacuolas autofágicas (Materiales 1.2.). Por lo tanto, podríamos encontrarnos con dos pacientes con problemas, tanto en la ruta de autofagia como en la glicosilación del  $\alpha$ -DG.

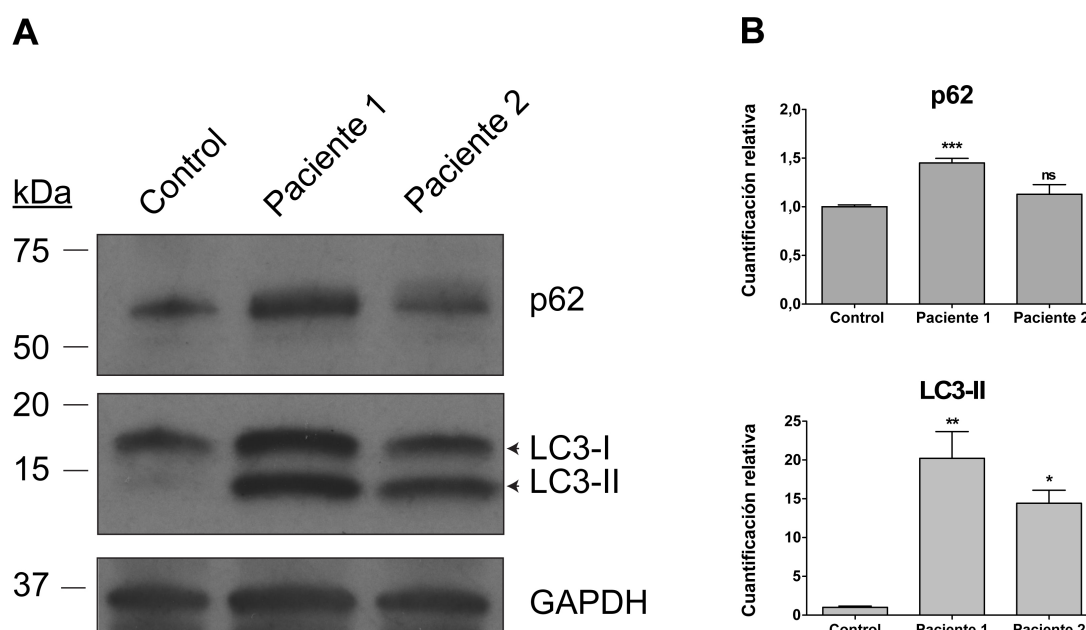
Para analizar el estado de la ruta de autofagia realizamos diferentes estudios moleculares de las proteínas p62 (proteína de reconocimiento de proteínas ubiquitinadas para degradación) y LC3-II (proteína de reconocimiento para lisosomas en el

autofagosoma). Se ha observado que ambas proteínas se acumulan en el modelo de ratón *knockout* para el gen *Epg5* (Zhao *et al.*, 2013).

### 1.3.1. Análisis por western blot de proteínas de autofagia

En la **Figura 12A** se pueden ver los resultados obtenidos por WB para ambas proteínas. En ellos se apreció una acumulación de p62 en ambos pacientes y en cantidad relativamente similar al control sano (panel superior). Sin embargo, para LC3-II se observa una acumulación importante de esta proteína en los pacientes, pero no en el control sano (panel central).

Para saber si esta acumulación es significativa con respecto al control sano, se repitieron los ensayos ( $n=3$ ) y se densitometraron los resultados. Estos estudios revelaron una acumulación significativa de p62 en el paciente 1 con respecto al control sano, pero no en el paciente 2 (**Figura 12B**); mientras que para LC3-II la acumulación fue significativa para ambos pacientes (**Figura 12B**).



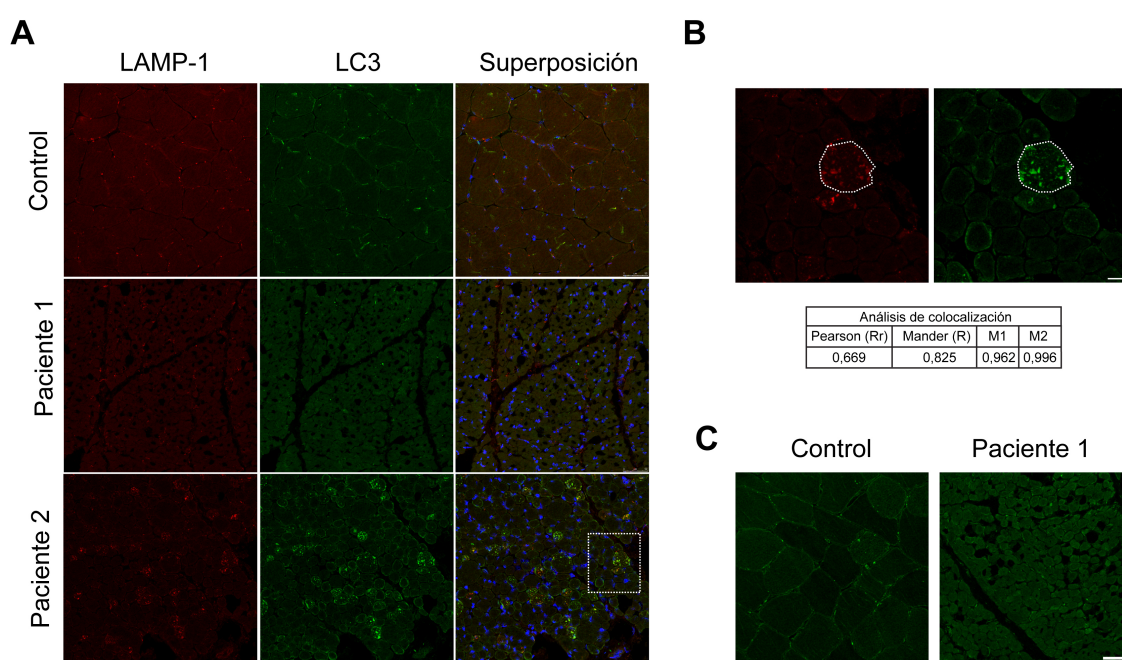
**Figura 12. Análisis por western blot de las proteínas p62 y LC3-II en los pacientes.** (A) Western blot representativo de los resultados obtenidos para p62 (panel superior) y LC3-II (panel central). Se analizó como control de carga la GAPDH (panel inferior). (B) Resultados de densitometría de los análisis por western blot ( $n=3$ ) para p62 (gráfica superior) y para LC3-II (gráfica inferior). Estadística: ANOVA de una vía con el test de Bonferroni; \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$ ; \*\*\*  $p<0,001$ .

### 1.3.2. Análisis por inmunohistofluorescencia de proteínas de autofagia

También se comprobó la expresión de estas de proteínas de autofagia mediante estudios de IHF en criosecciones de tejido muscular de los pacientes. En estos estudios se

analizó la colocalización entre la proteína LC3 (marcadora de autofagosoma) y la proteína LAMP1 (marcadora de lisosomas).

Tanto en el control como en el paciente 1 no se encontró colocalización entre ambas proteínas, y tampoco se observó acumulación de LC3 en el paciente 1 (**Figura 13A**, paneles superior y central, respectivamente). Por su parte, en el paciente 2 sí se detectaron en el interior de varias fibras unos acúmulos que se marcaban con el anticuerpo contra LC3 (**Figura 13A**, panel inferior). Estos acúmulos colocalizaban, en algunas fibras, con la proteína LAMP1. Un estudio más en detalle de una de estas fibras con acúmulos (**Figura 13B**) reveló una buena colocalización de la señal entre LAMP1 y LC3.



**Figura 13. Inmunohistofluorescencias en tejido muscular contra LAMP1, p62 y LC3.** (A) Coinmunohistofluorescencia LAMP1-LC3 en tejido muscular control y de los pacientes 1 y 2. Tanto en el control como en el paciente 1 no se encontró colocalización ni acumulación de estas proteínas. En el paciente 2 se aprecia acumulación de LC3 y LAMP1 en el interior de las fibras musculares. (B) Ampliación de la fibra señalada en A con un cuadro discontinuo. La región señalada en línea discontinua se analizó mediante el *plugin* ICA de la aplicación ImageJ para conocer el índice de colocalización. La tabla debajo de la imagen muestra los resultados obtenidos para la correlación de Pearson y Mander. M1 hace referencia a la intensidad de señal en el canal rojo que colocaliza con el verde, y M2 hace referencia a lo contrario. Ambos parámetros están cercanos a uno, así como la correlación de Mander, lo cual podría ser indicativo de una buena colocalización en esta fibra. (C) Inmunohistofluorescencia para p62 en tejido muscular control y del paciente 1. No se apreció acúmulo de la señal en ninguna de las muestras. Escalas en A y C, 50  $\mu$ m; en B, 10  $\mu$ m.

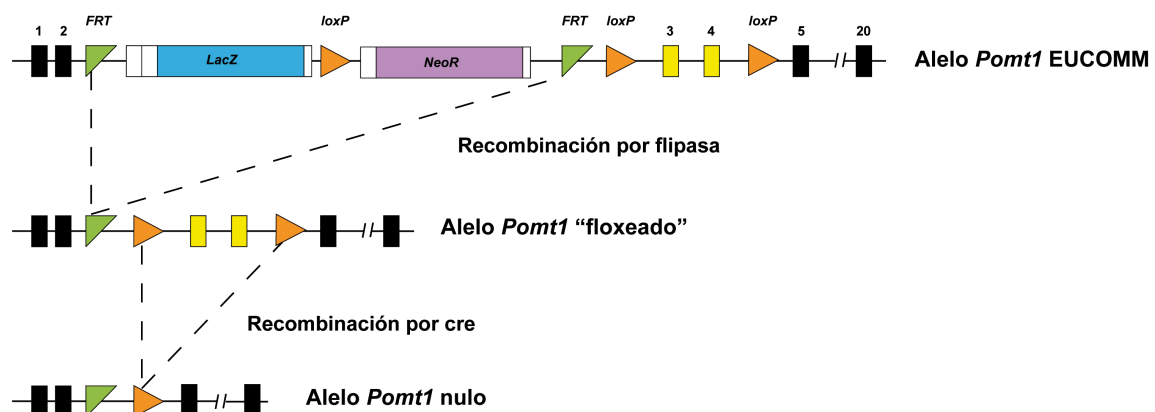
El análisis para p62 en el paciente 1 no mostró tampoco acúmulos en el interior de las fibras (**Figura 13C**). En el caso del paciente 2, los estudios de p62 por inmunohistoquímica realizados con anterioridad en el hospital revelaron acúmulos en el interior de las fibras (Materiales 1.2.).

## 2. Generación de un modelo animal de distroglicanopatía en retina

En este apartado de este trabajo de tesis se presentarán los resultados obtenidos de la generación y parte de la caracterización de un modelo animal *knockout* condicional para el gen *Pomt1* en la retina de ratón.

### 2.1. Generación de modelo knockout condicional en retina

La generación del animal modelo *knockout* condicional en *Pomt1* (*Pomt1* KOc) se basa en la eliminación de diferentes secuencias mediante la recombinación homóloga causada por dos recombinasas: una primera recombinación llevada a cabo por la recombinasa flipasa, que convierte los alelos EUCOMM en alelos “floxeados”, y una posterior recombinación mediada por la recombinasa cre, que elimina los exones a los que flanquean las secuencias *loxP*, generando así el alelo nulo (**Figura 14**). La recombinasa cre seleccionada para la generación de este modelo *Pomt1* KOc se expresa en los fotorreceptores de la retina bajo control del promotor del factor de transcripción *Crx* específico de este tipo celular (Furukawa *et al.*, 2002).



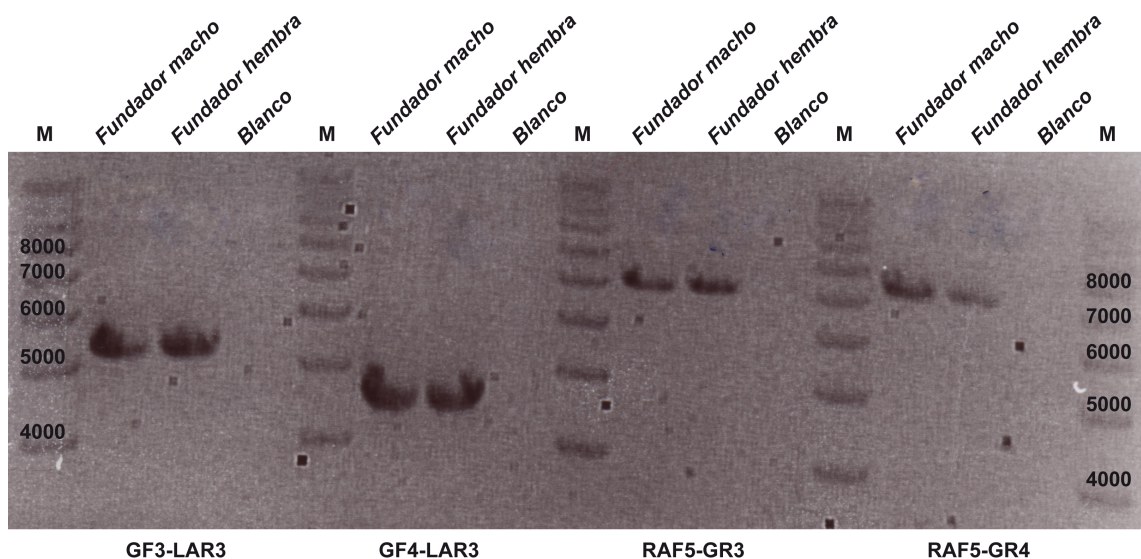
**Figura 14. Estrategia para la generación de alelos nulos *Pomt1*.** Se muestran los tres alelos posibles en la generación de este modelo animal: a) el alelo *Pomt1* EUCOMM, que contiene todavía las secuencias de selección; b) el alelo *Pomt1* “floxeado”, con los exones 3 y 4 (en amarillo) flanqueados por secuencias *loxP*; y c) el alelo nulo de *Pomt1*, donde se han eliminado los exones 3 y 4. La conversión de unos alelos en otros es dirigida por la acción de diferentes recombinasas: de EUCOMM a “floxeado”, por la acción de recombinasa flipasa que elimina las secuencias del genoma entre *FRT*s; y de alelo “floxeado” a nulo, por la recombinasa cre que deleta el ADN existente entre secuencias *loxP*. *FRT*, secuencia de reconocimiento de la flipasa; *loxP*, secuencia de reconocimiento para la recombinasa cre; *lacZ*, secuencia de la  $\beta$ -galactosidasa; *NeoR*, secuencia de resistencia a neomicina; rectángulos en negro, exones de *Pomt1*.

El primer paso en la generación de este modelo fue la generación de animales que portaban el alelo *Pomt1* del EUCOMM en heterocigosis. Éste se realizó mediante la generación de animales quimera, por agregación de mórulas CD1 con células embrionarias



modificadas en *Pomt1* (generadas por EUCOMM), y posterior retrocruzamiento (Métodos 2.3.).

De los animales obtenidos se seleccionaron un macho y una hembra, en los que se comprobó la correcta localización de la modificación generada por EUCOMM en el gen *Pomt1* mediante LR-PCR (**Figura 15**). También, mediante PCR combinada con secuenciación, se comprobó la ausencia de cambios a lo largo de toda esta construcción (datos no mostrados). Una vez confirmado el correcto posicionamiento y la ausencia de cambios en la secuencia, ambos animales se seleccionaron como fundadores para la línea *Pomt1* KOc.



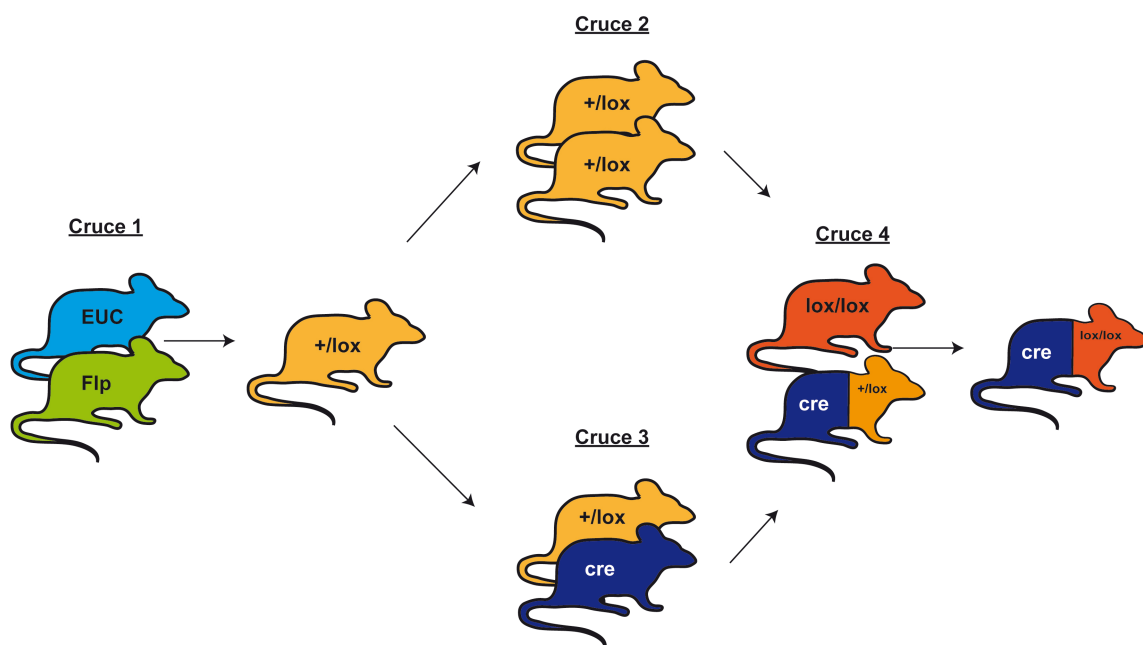
**Figura 15. LR-PCR para la comprobación del correcto posicionamiento de la modificación EUCOMM en el gen *Pomt1*.** Se muestran los fragmentos de las cuatro PCR diseñadas por EUCOMM para la comprobación de la correcta localización. En cada una de ellas se muestra el resultado para el macho y la hembra seleccionados como fundadores de la línea *Pomt1* KOc. En la parte inferior se muestran los cebadores utilizados para cada PCR. Para los cebadores GF3-LAR3 y GF4-LAR3, correspondientes a la región del brazo izquierdo de homología, los pesos moleculares obtenidos de aproximadamente 5.500 pb y 4.700 pb corresponden con lo esperado. Para los otros cebadores (RAF5-GR3 y RAF5-GR4) correspondientes al brazo derecho de homología, los pesos moleculares observados (7.500 pb y 7.800 pb aproximadamente) también se corresponden con lo esperado. Entre cada PCR se coloca como marcador de peso molecular la escalera de 1 kb (M), y los pesos moleculares correspondientes se observan a ambos extremos de la figura. Blanco, sin ADN.

Para la obtención del modelo *Pomt1* KOc se diseñó un sistema de cruces que nos permitiera obtener animales con ambos alelos *Pomt1* nulos (**Figura 16**). Los animales fundadores de la línea EUCOMM (en azul claro) se cruzaron con animales transgénicos que portan la recombinasa flipasa (en verde), obteniendo de esta manera animales portadores del alelo *Pomt1* “floreado” (en naranja).

Estos animales portarían este alelo en heterocigosis (*Pomt1*<sup>+/lox</sup>), y fueron utilizados para generar dos nuevas líneas (cruces 2 y 3, **Figura 16**). En primer lugar, una línea

homocigota para el alelo *Pomt1* “floxeado” o *Pomt1*<sup>lox/lox</sup> (en naranja oscuro), la cual nos permitiría en futuros cruces aumentar el porcentaje de animales *Pomt1* KOc. La segunda línea generada partió del cruce entre animales *Pomt1*<sup>+/lox</sup> y animales transgénicos portadores de la recombinasa cre dirigida por el promotor *Crx*, (*Crx-cre*, en azul oscuro,). Los animales nacidos de este cruce portaban el transgén *Crx-cre* y el alelo *Pomt1* “floxeado” en heterocigosis (*Crx-cre/Pomt1*<sup>+/lox</sup>).

Por último, para la generación del modelo *Pomt1* KOc se cruzaron animales *Pomt1*<sup>lox/lox</sup> con animales *Crx-cre/Pomt1*<sup>+/lox</sup> (cruce 4, **Figura 16**). Entre los animales generados obtuvimos portadores en homocigosis de los alelos “floxeados” conjuntamente con el transgén cre (*Crx-cre/Pomt1*<sup>lox/lox</sup>). Estos últimos deberían presentar en su retina los alelos *Pomt1* nulos (*Pomt1*<sup>-/-</sup>) generados por acción de la recombinasa cre.

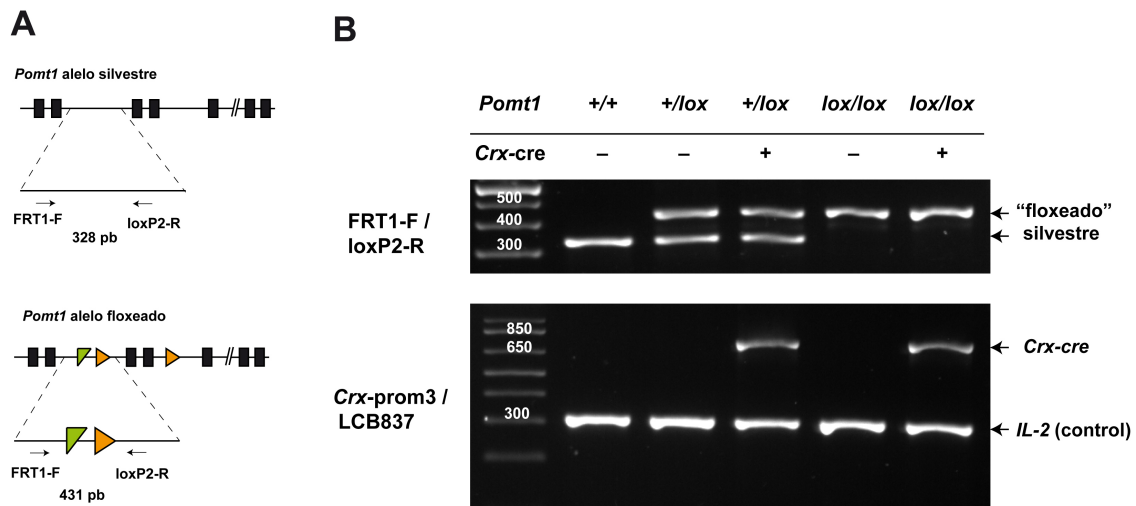


**Figura 16. Esquema de cruces para la generación de animales *Pomt1* KOc.** En la figura se muestran las diferentes líneas generadas para el modelo *Pomt1* KOc y los animales utilizados para ellos. El cruce 1 consistió en el apareamiento de ratones con el alelo *Pomt1* EUCOMM en heterocigosis (EUC, azul claro) con animales transgénicos flipasa (Flp, verde). Este cruce genera animales con el alelo *Pomt1* “floxeado” en heterocigosis (+/lox, en naranja). El cruce 2 entre estos animales *Pomt1*<sup>+/lox</sup>, genera animales homocigotos *Pomt1*<sup>lox/lox</sup> (naranja oscuro). El cruce 3 de animales *Pomt1*<sup>+/lox</sup> con animales transgénicos *Crx-cre* (cre, en azul oscuro) genera animales *Crx-cre/Pomt1*<sup>+/lox</sup>. Y el cruce 4 entre animales *Pomt1*<sup>lox/lox</sup> y *Crx-cre/Pomt1*<sup>+/lox</sup> dará lugar a animales *Crx-cre/Pomt1*<sup>lox/lox</sup>.

Para la selección de cada uno de los animales deseados se diseñaron PCRs que discernían cada uno de los genotipos. Para el alelo *Pomt1* “floxeado” se diseñó una pareja de oligonucleótidos que permitía diferenciar el alelo silvestre del alelo “floxeado” por la diferencia de tamaño generada debido a la presencia añadida de las secuencias *FRT* y *loxP*



(Figura 17A). Para el genotipado del transgén *Crx-cre* se utilizaron los oligonucleótidos diseñados por el repositorio comercial RIKEN del que se obtuvieron dichos ratones. En la Figura 17B, se pueden observar los resultados obtenidos de estos genotipados.



**Figura 17. Genotipado de los diferentes alelos de *Pomt1* y el transgén *Crx-cre*.** (A) Diagramas de localización de los cebadores para el genotipado de los alelos *Pomt1* silvestre (arriba) y "floxeado" (abajo). El alelo silvestre genera un fragmento de 328 pb, mientras que el "floxeado" genera un fragmento de 431 pb, el cual contiene las secuencias FRT (verde) y loxP (naranja). (B) Genotipado de alelos *Pomt1* (superior) y transgén *Crx-cre* (inferior). Los animales sin alelos "floxeados" (*Pomt1*<sup>+/+</sup>) (panel superior) solo presentan la banda inferior de 328 pb; los heterocigotos (*Pomt1*<sup>+/*lox*</sup>) una doble banda de 328 y 431 pb; y los homocigotos (*Pomt1*<sup>*lox/lox*</sup>) una única banda de 431 pb. Los animales portadores del transgén *Crx-cre* (panel inferior) se seleccionan por la aparición de una banda a 737 pb. La banda control de interleuquina-2 (*IL-2*) de esta PCR aparece en todos los animales a 300 pb. Como marcador de peso molecular se usa la escalera de 100 pb (izquierda).

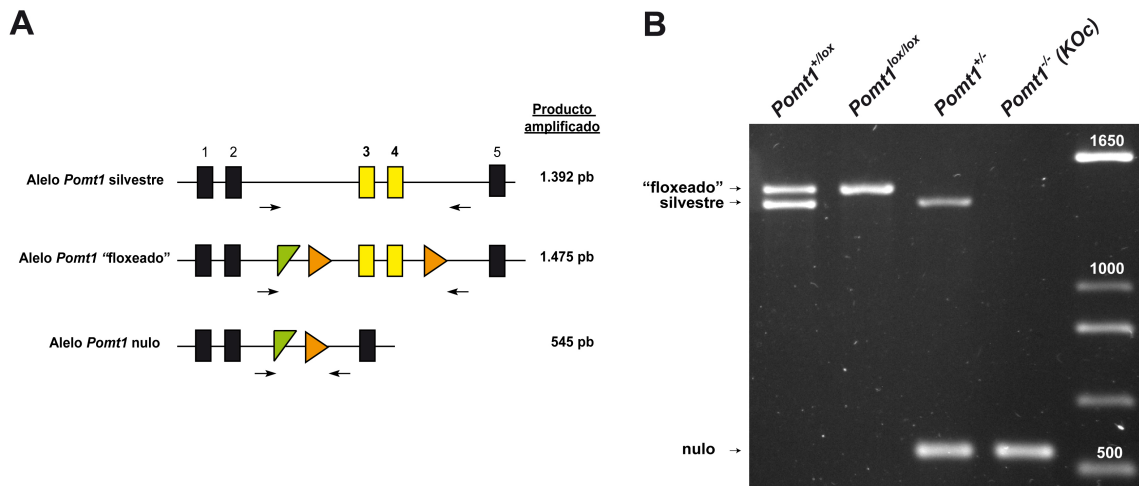
## 2.2. Estudio de expresión de *Pomt1* en retina

Una vez se obtuvieron los animales con el genotipo *Crx-cre/Pomt1*<sup>*lox/lox*</sup>, se analizó si en sus retinas los exones 3 y 4 habían sido delecionados por la acción de la recombinasa cre, con lo que confirmaríamos la generación del modelo *Pomt1*<sup>-/-</sup> (*Pomt1* KOc).

Para ello se diseñó una nueva pareja de cebadores que detectaba por PCR todos los posibles alelos en estos animales (Figura 18A). Esta pareja de cebadores se utilizó sobre ADN extraído de las retinas de animales *Crx-cre/Pomt1*<sup>*lox/lox*</sup>, y se utilizaron como controles los hermanos de camada con los siguientes genotipos: *Crx-cre/Pomt1*<sup>+/*lox*</sup>, *Pomt1*<sup>+/*lox*</sup> y *Pomt1*<sup>*lox/lox*</sup>.

Los resultados de esta PCR (Figura 18B) demostraron que los animales no portadores del transgén *Crx-cre* (carril 1 y 2) solo tenían las bandas correspondientes al alelo silvestre (1.392 pb) y/o al alelo "floxeado" (1.475 pb), en función del genotipo. En los animales genotipados como *Crx-cre/Pomt1*<sup>+/*lox*</sup> (tercer carril) se observó tanto la banda correspondiente al alelo nulo (545 pb) como la banda del alelo silvestre, siendo por lo tanto

animales heterocigotos para la mutación (*Pomt1*<sup>+/-</sup>). En el último caso, en el animal con genotipo *Crx-cre/Pomt1*<sup>lox/lox</sup> no se detectaron alelos silvestres o “floreados” y sí la presencia de alelos nulos, por lo que estos animales son portadores de la mutación en homocigosis (*Pomt1*<sup>-/-</sup>), encontrándonos entonces ante el modelo *Pomt1* KOc.

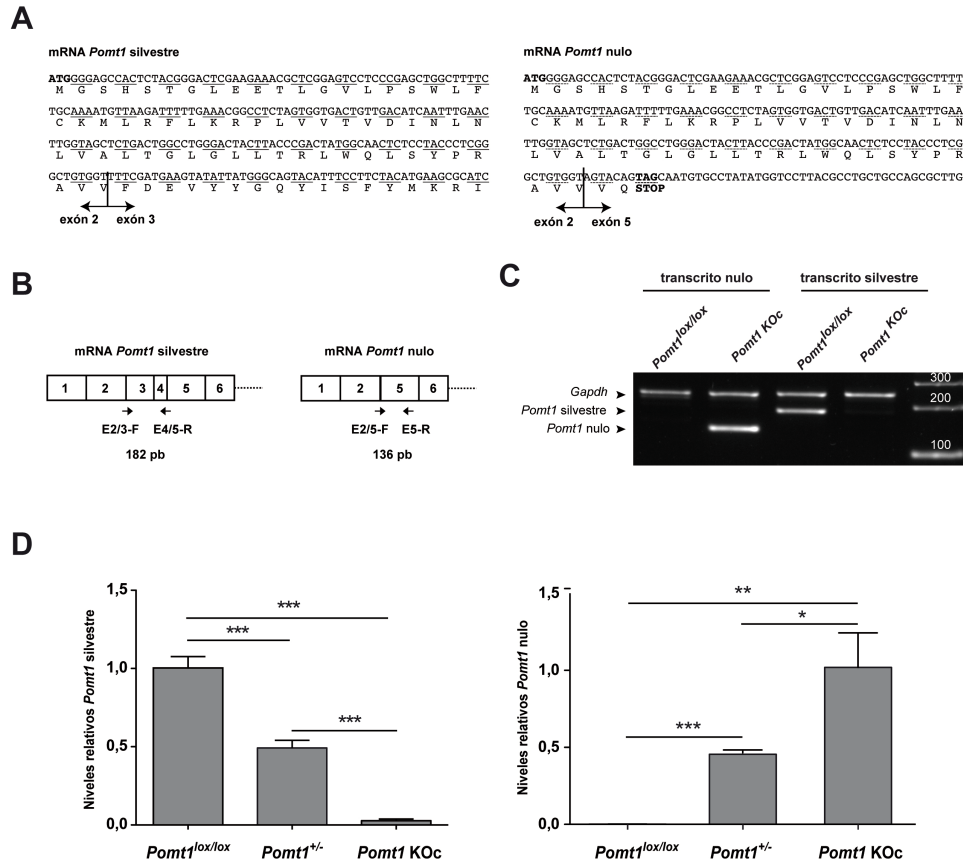


**Figura 18. PCR para la detección de alelos nulos en retina.** (A) Alelos detectados y posición de los oligonucleótidos utilizados. Ambos se localizan en la misma posición, y la diferencia en el tamaño amplificado se basa en la presencia o ausencia de diferentes secuencias en el amplicón. (B) Resultado del análisis por PCR sobre ADN extraído de la retina de animales *Pomt1*<sup>+/*lox*</sup> (carril 1), *Pomt1*<sup>lox/*lox*</sup> (carril 2), *Crx-cre/Pomt1*<sup>+/*lox*</sup> (carril 3) y *Crx-cre/Pomt1*<sup>lox/*lox*</sup> (carril 4). Los animales que no portan transgén *Crx-cre* (carriles 1 y 2) solo presentan las bandas correspondientes a los alelos floreados (1.475 pb) o silvestre (1.392 pb). En cambio, la presencia del transgén *Crx-Cre* (carriles 3 y 4) genera la aparición de alelos nulos (545 pb). Cuando aparece en heterocigosis con el alelo silvestre (carril 3), este animal es el heterocigoto *Pomt1*<sup>+/-</sup>, y cuando lo hace en homocigosis se genera, el modelo *knockout Pomt1*<sup>-/-</sup> (*Pomt1* KOc). A la derecha se muestra el marcador de peso molecular de 1 kb con algunos tamaños detallados.

Además, la delección de los exones 3 y 4 daría lugar a la generación de un ARN transcrito con un codón de parada prematuro generado por la fusión de los exones 2 y 5 (Figura 19A). Para comprobar la existencia del mismo, se diseñaron dos parejas de oligonucleótidos capaces de diferenciar entre el ARN transcrito silvestre y el nulo (Figura 19B). Ambas parejas se utilizaron en experimentos de RT-PCR sobre el ARN extraído de las retinas de un animal control (*Pomt1*<sup>lox/lox</sup>) y un animal *Pomt1* KOc (*Pomt1*<sup>-/-</sup>). El resultado obtenido mostró la existencia del ARN transcrito nulo solo en el animal *Pomt1* KOc y ninguna banda correspondiente al silvestre, y lo contrario en el caso del animal control (Figura 19C).

Estos resultados se comprobaron mediante PCR cuantitativa (qPCR), utilizándose las mismas parejas de cebadores (Figura 19B) e incluyendo en el estudio animales heterocigotos (*Pomt1*<sup>+/*lox*</sup>). Los resultados obtenidos (Figura 19D) corroboraron los análisis por RT-PCR de los animales *Pomt1*<sup>lox/lox</sup> y *Pomt1* KOc, mientras que en los animales

*Pomt1*<sup>+/lox</sup> se detectaron ambos ARNs transcritos a unos niveles del 50% aproximadamente cada uno, lo cual concordaba con su condición de heterocigotos. El estudio estadístico, llevado a cabo por el análisis de varianza ANOVA de una vía, demostró que existe un efecto del genotipo para los niveles de ARN silvestre ( $F_{(2,9)} = 365$ ;  $p < 0,0001$ ) y para los de ARN nulo ( $F_{(2,9)} = 61,9$ ;  $p < 0,0001$ ), y el estudio *post hoc* de Bonferroni demostró diferencias significativas entre todos los grupos.

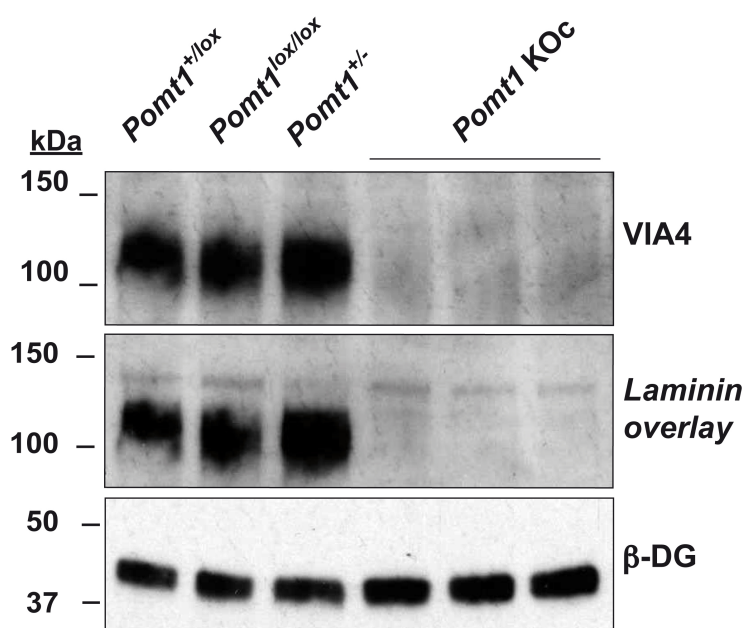


**Figura 19. Análisis de expresión de los ARNs mensajeros de *Pomt1* silvestre y nulo. (A)** Secuencias de los ARNm silvestre (izquierda) y nulo (derecha) de *Pomt1*. Se indican el ATG inicio de traducción (en negrita), y con flechas, el límite entre los exones 2 y 3 (silvestre) o exones 2 y 5 (nulo). En este último la eliminación de los exones 3 y 4 generaría un codón de parada prematuro (TAG, en negrita). **(B)** Diagrama de los ARNs de *Pomt1* silvestre (izquierda) o nulo (derecha) donde se indican las posiciones de los cebadores utilizados en la RT-PCR y la qPCR. Para el ARNm silvestre los cebadores se han diseñado en los límites de los exones 2 y 3 (E2/3-F) y exones 4 y 5 (E4/5-R), que generarían un producto de 182 pb; para el ARNm nulo, el cebador directo se encuentra en la unión de los exones 2 y 5 (E2/5-F) y el reverso en el exón 5 (E5-R), generándose un producto de 136 pb. **(C)** RT-PCR del ARN extraído de retinas de *Pomt1*<sup>lox/lox</sup> o de *Pomt1* KOc (*Pomt1*<sup>-/-</sup>). Para la RT-PCR de detección del ARNm nulo solo se obtiene la banda esperada en el animal *Pomt1* KOc, mientras que en el caso de la detección del ARNm silvestre solo se observa en el animal *Pomt1*<sup>lox/lox</sup>. **(D)** qPCR para ARN extraído de retinas de *Pomt1*<sup>lox/lox</sup> (n=4), *Pomt1*<sup>+/lox</sup> (n=4) o *Pomt1* KOc (*Pomt1*<sup>-/-</sup>) (n=4). Se observan diferencias estadísticas en los niveles (media  $\pm$  SEM) del ARNm silvestre y del ARNm nulo entre los tres grupos de estudio. El ARNm silvestre solo es detectable en aquellos animales con alelos silvestres o "floxeados", mientras que el ARNm nulo lo es en aquellos con alelos nulos. Los animales heterocigotos presentan niveles al 50% de cada uno de ellos. Estadística: ANOVA de una vía con test *post hoc* de Bonferroni. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

### 2.3. Análisis de glicosilación del $\alpha$ -dístroglicano en la retina del ratón *Pomt1* KOc

Una vez comprobada la delección de los exones 3 y 4 y su efecto sobre el ARNm de *Pomt1* se realizaron experimentos de WB para evaluar el estado de la glicosilación del  $\alpha$ -DG en la retina del modelo *Pomt1* KOc. Para ello se obtuvieron proteínas de la retina de animales *Pomt1* KOc, del heterocigoto *Pomt1*<sup>+/-</sup> y de dos controles diferentes (*Pomt1*<sup>lox/lox</sup> y *Pomt1*<sup>+/-</sup>). Estos extractos se enriquecieron mediante WGA, y la glicosilación del  $\alpha$ -DG se comprobó mediante el anticuerpo VIA4 (**Figura 20**, panel superior). Los resultados obtenidos demostraron que el modelo *Pomt1* KOc no presentaba glicosilación del  $\alpha$ -DG a diferencia de los controles y el animal *Pomt1*<sup>+/-</sup>.

Este resultado se comprobó también mediante experimentos de recubrimiento con laminina (*laminin overlay*), donde se estudió la capacidad de unión de la laminina al  $\alpha$ -DG (**Figura 20**, panel central). Los resultados obtenidos fueron los mismos que para el estudio con el anticuerpo VIA4. Por último, se comprobó que la subunidad  $\beta$ -DG no presentaba variaciones en ninguno de los animales utilizados (**Figura 20**, panel inferior).



**Figura 20. Análisis de la glicosilación del  $\alpha$ -DG en la retina mediante western blot.** En el panel superior se ven los resultados obtenidos para el estudio con el anticuerpo VIA4 que detecta los residuos glicosílicos del  $\alpha$ -DG. Los animales *Pomt1*<sup>lox/lox</sup> y *Pomt1*<sup>+/-</sup> (usados como control), así como el animal heterocigoto *Pomt1*<sup>+/-</sup> presentaron una señal similar y a la altura de 120 kDa, esperable del  $\alpha$ -DG glicosilado. Por su parte, los tres animales *Pomt1*<sup>-/-</sup> estudiados no presentaron en ningún caso esta señal. En el panel central se muestran los resultados del experimento del recubrimiento con laminina (*laminin overlay*), que corroboraron los resultados obtenidos con el anticuerpo VIA4. El panel inferior muestra los resultados obtenidos utilizando el anticuerpo contra  $\beta$ -DG, en donde no se apreciaron diferencias entre ninguno de los animales.

En resumen, los resultados han mostrado la generación de un animal modelo de distroglicanopatía, ya que en sus retinas no se detecta la glicosilación de la subunidad  $\alpha$ -DG.

La caracterización histológica de la retina de estos animales, así como los estudios de la funcionalidad de estas retinas han sido realizados por otros grupos en colaboración con el nuestro. Los resultados de esta segunda parte de la caracterización se muestran en el manuscrito del **Anexo II**, y serán comentados en el apartado posterior de Discusión.

### **3. Estudio de la función de FKTN y FKRP en la línea celular C2C12**

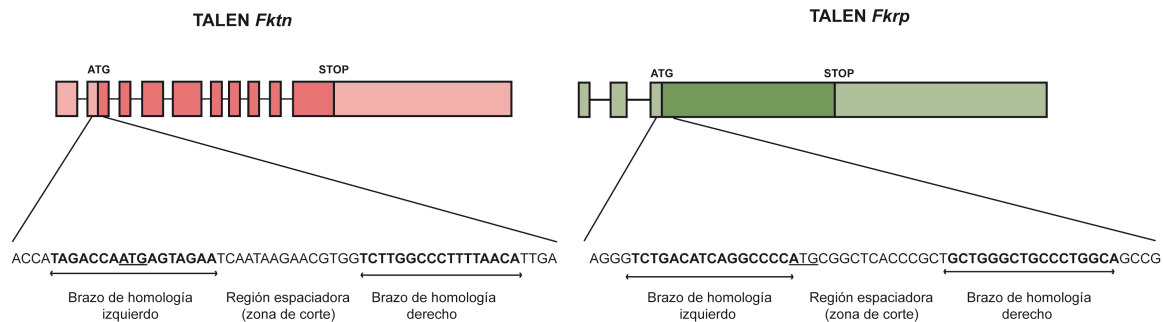
En este último apartado de esta tesis doctoral se exponen los resultados obtenidos de la generación y caracterización de las líneas celulares *knockout* (KO) para los genes *Fktn* y *Fkrp* mediante la tecnología TALEN.

#### **3.1. Generación de líneas C2C12 *knockout* para *Fktn* y *Fkrp***

##### **3.1.1. Diseño y transfección de plásmidos TALEN en mioblastos C2C12**

Con el objetivo de conocer la función que FKTN y FKRP desempeñan en la glicosilación del  $\alpha$ -DG se generaron líneas celulares KO para estos genes. Previamente en el laboratorio se había intentado este objetivo mediante la técnica de silenciamiento génico de ambos ARNs, no obteniéndose un silenciamiento total, por lo que todavía se seguía detectando  $\alpha$ -DG glicosilado. Por ello se decidió generar clones con mutaciones a nivel génico (ADN) mediante la tecnología TALEN. Este sistema se basa en proteínas de fusión que contienen una región proteica de unión a ADN unida a la endonucleasa FokI. Este estudio se llevó a cabo en la línea de mioblastos de ratón C2C12.

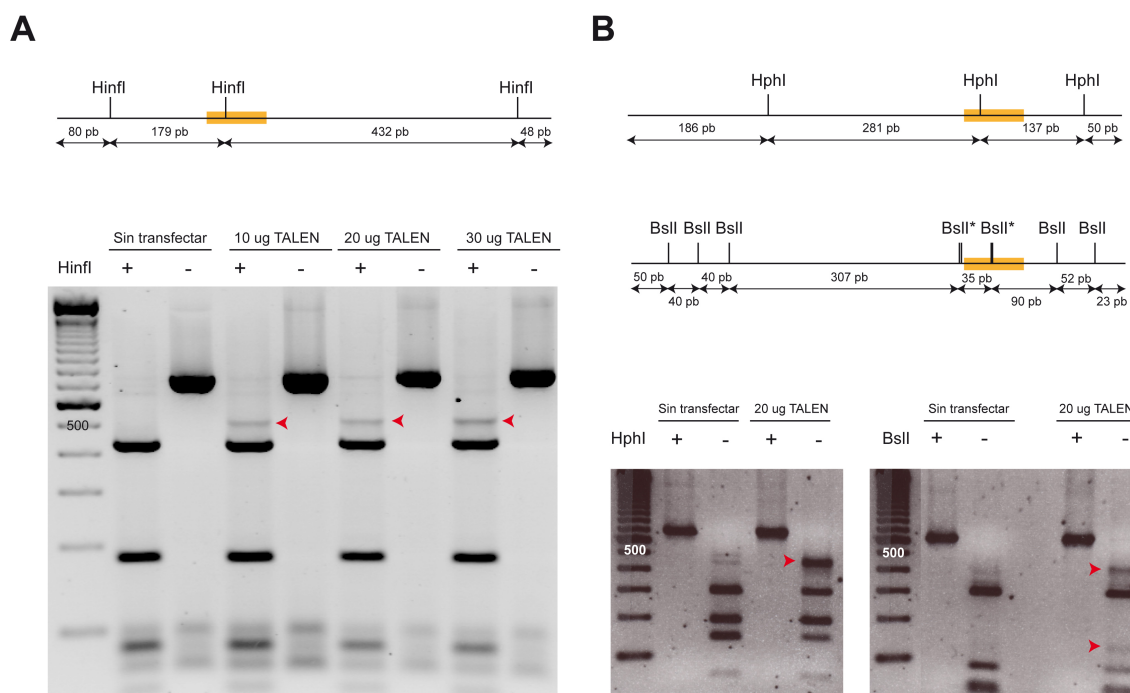
Para esta edición génica se diseñaron dos parejas de plásmidos TALEN, una pareja para el gen *Fktn* y otra para el gen *Fkrp* del ratón. Las regiones de unión con el ADN se diseñaron cercanas a los codones de iniciación (ATG) de ambos genes (**Figura 21**). Los vectores recombinantes fueron generados por la empresa Collectis y enviados a nosotros para su uso.



**Figura 21. Sitios de edición por TALEN para los genes *Fktn* y *Fkrp*.** Se muestra una representación esquemática de los genes *Fktn* y *Fkrp* del ratón, donde cada uno de los rectángulos representa un exón del gen. En un color más oscuro se detallan los exones que forman parte de la secuencia codificante. En la parte inferior se muestra la región ampliada donde se han diseñado las secuencias TALEN para ambos genes. En negrita sobre la secuencia se resaltan las zonas con las que tiene homología cada una de las TALEN (brazos izquierdo y derecho). Subrayado se marca el codón de iniciación de la traducción ATG, que en ambos casos forma parte o bordea los brazos izquierdos de homología. Entre las regiones de homología se observa la región espaciadora que sería la región donde tendría lugar el corte por la endonucleasa FokI.

Los plásmidos TALEN se nucleofectaron en diferente cantidad en la línea celular C2C12. Posteriormente, para comprobar si el sistema TALEN había actuado, se realizó un ensayo de digestión por enzimas de restricción sobre un fragmento amplificado por PCR de la región de acción de las TALENs (**Figura 22**). La mala reparación por NHEJ sobre esta región del gen *Fktn* provocaría la pérdida de una diana HinfI, con la consiguiente aparición de un fragmento de 512 pb. En los tres grupos de células transfectadas (10, 20 y 30  $\mu$ g) se pudo observar la aparición de esta banda (**Figura 22A**). En las células transfectadas con los plásmidos TALEN-*Fkrp* se realizó este ensayo con otras dos enzimas de restricción cuyas dianas también se localizaban en la región de acción: HphI y BslI. En el caso de la HphI comprobamos la aparición, en el grupo de células transfectadas con 20  $\mu$ g, de la banda de 418 pb correspondiente con la desaparición de la diana HphI en la región de acción de la endonucleasa FokI (**Figura 22B**). Este resultado también se comprobó con la enzima de restricción BslI, al detectarse una banda de 120 pb correspondiente con la desaparición de su diana de reconocimiento en el sitio de acción de la endonucleasa FokI (**Figura 22B**). Con BslI también se detectaron, en este mismo grupo de células, bandas de alrededor de 400 pb, que podrían corresponder con la pérdida de dianas BslI cercanas (**Figura 22B**).



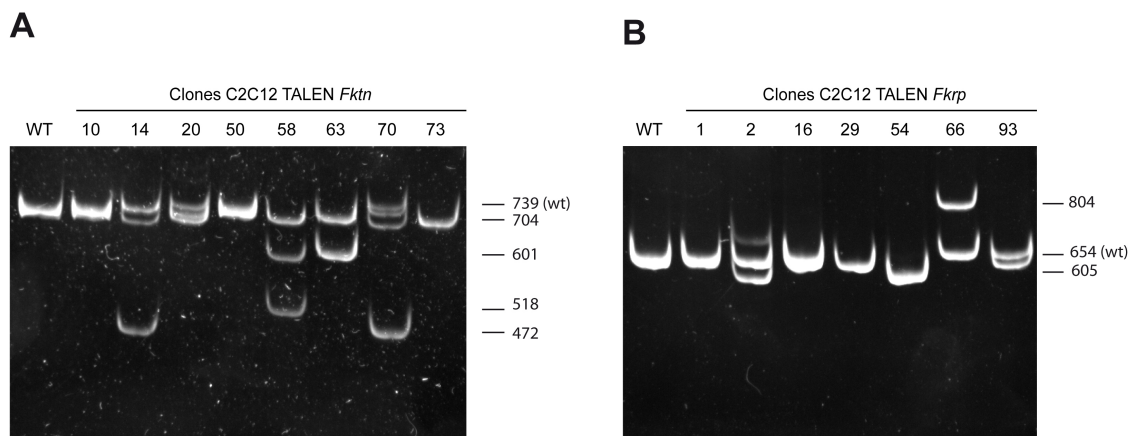


**Figura 22. Análisis de restricción en el DNA de células C2C12 transfectadas con plásmidos TALEN. (A)** Análisis con la enzima de restricción *HinfI* en células transfectadas con los plásmidos TALEN-*Fktn*. En la parte superior se muestran los sitios de restricción *HinfI* sobre el fragmento de 739 pb amplificado por PCR, y los tamaños moleculares que se generarían. La región de acción de las TALEN (en naranja) coincide con el segundo sitio de corte para *HinfI*. En la parte inferior se muestra el resultado de la digestión con *HinfI* para el grupo de células no transfectadas y para las transfectadas con 10, 20 y 30  $\mu$ g de los plásmidos. En estos tres últimos se observó la aparición de una banda (puntas de flecha) no observable en el control sin transfección. Esta banda de aproximadamente 500 pb coincidiría con la pérdida del segundo sitio de corte para *HinfI*. **(B)** Análisis con las enzimas de restricción *HphI* y *BslI* en los grupos de células transfectadas con TALEN-*Fkrp*. En la parte superior se muestran el sitio de acción de las TALEN (en naranja) y los tamaños moleculares generados por estas enzimas sobre el fragmento de PCR de 654 pb. En la parte inferior se muestra el resultado de estas digestiones para el grupo no transfectado y para el transfectado con 20  $\mu$ g de TALEN-*Fkrp*. A la izquierda, el resultado del corte con la enzima *HphI* muestra la aparición de una banda de unas 400 pb (punta de flecha roja) que se correspondería con la desaparición del sitio *HphI* en la región de acción. En el corte con la enzima *BslI* (imagen inferior derecha) se muestra la aparición de dos bandas con respecto al control no transfectado. La más inferior, a un tamaño molecular de unas 120 pb, correspondería con la desaparición del sitio localizado en la región de acción TALEN (punta de flecha roja inferior). Y la banda superior a un tamaño de 400 pb (punta de flecha superior) se debería no solo a la pérdida de la anterior diana sino también, probablemente, a la pérdida de otra diana localizada a 5' de la región de corte. *BslI*\*, en este punto se encuentran dos dianas de restricción *BslI* solapadas.

### 3.1.2. Generación de clones individuales y caracterización de las mutaciones

Una vez se hubo comprobado la acción de los plásmidos TALEN sobre el total de las células C2C12, se procedió a la selección individual de clones mutantes. Para ello, partiendo de los grupos celulares que fueron transfectados con 20  $\mu$ g, se realizó una dilución límite, obteniéndose aproximadamente 100 clones individuales de cada uno de los experimentos TALEN.

Utilizando la misma amplificación por PCR que en el experimento anterior para el análisis con enzimas de restricción se seleccionaron 8 clones TALEN-*Fktn* y 7 clones TALEN-*Fkrp* para su posterior caracterización (**Figura 23**).



**Figura 23. Amplicones de PCR de la región TALEN en células C2C12 silvestre y en clones TALEN-*Fktn* y TALEN-*Fkrp* resueltos en electroforesis en gel de poliacrilamida.** (A) Amplicones para la PCR de la región de acción TALEN en células C2C12 silvestre (WT) y en los clones TALEN-*Fktn* números 10, 14, 20, 50, 58, 63, 70 y 73. Se observa la aparición de bandas de menor tamaño a la silvestre (wt) en varios de los clones. A la derecha se muestran los pesos moleculares de algunas de las bandas deducidos de la secuenciación posterior y que sirven como guía. Se detalla el peso molecular de la banda silvestre (wt) de 739 pb. (B) Amplicones para la PCR de la región de acción TALEN en células C2C12 silvestre y en los clones TALEN-*Fkrp* números 1, 2, 16, 29, 54, 66 y 93. Se observa la aparición de bandas de menor y mayor peso molecular con respecto al control silvestre (wt). A la derecha se muestran los pesos moleculares de algunas de las bandas deducidos de la secuenciación posterior y que sirven como guía. Se detalla el peso molecular de la banda silvestre (wt) de 654 pb.

El resultado de la PCR de los clones seleccionados mostró la aparición de varias bandas de peso molecular inferior al control silvestre (p.ej. en el clon 58 de *Fktn* o en el clon 2 de *Fkrp*, **Figura 23**), y también la aparición de bandas de peso molecular superior (clon 66 *Fkrp*). Asimismo se seleccionaron para su estudio clones que tuvieran la misma banda que el control silvestre, y que serían utilizados como controles en este estudio.

Para caracterizar las mutaciones presentes en cada uno de los clones seleccionados y debido a la presencia de bandas de peso molecular muy similar y de difícil purificación por separado, los fragmentos de PCR se clonaron en el plásmido *pBluescript*, y posteriormente se aislaron clones bacterianos que portaban cada uno de los fragmentos. Éstos se secuenciaron y el resultado obtenido se muestra en la **Tabla 33**. En algunos de estos clones se han obtenido más de dos bandas, indicativo de la poliploidía de esta línea celular (ver Discusión).



**Tabla 33. Mutaciones encontradas por secuenciación en los clones TALEN**

<b>Clones TALEN-<i>Fktn</i></b>		
<b>Número de clon</b>	<b>Bandas clonadas</b>	<b>Cambios detectados</b>
Clon 10	1 banda	Sin mutación – silvestre
Clon 14	3 bandas	Sin mutación – silvestre c.[15_19del; 23G>T] ( $\Delta$ 5pb + SNV) c.-217_33del ( $\Delta$ 250pb)
Clon 20	4 bandas	Sin mutación – silvestre c.[17A>T; 18G>A] (2 SNVs) c.16_18del ( $\Delta$ 3pb) c.17_20del ( $\Delta$ 4pb)
Clon 50	1 banda	Sin mutación – silvestre
Clon 58	4 bandas	c.15_16insAAGA (ins4pb) c.5_24del ( $\Delta$ 20pb) c.11_105+43del ( $\Delta$ 138pb) c.-199_21del ( $\Delta$ 221pb)
clon 63	2 bandas	c.11_14del ( $\Delta$ 4pb) c.2_103del ( $\Delta$ 103pb)
Clon 70	4 bandas	Sin mutación – silvestre c.13_15del ( $\Delta$ 3pb) c.5_46del ( $\Delta$ 42pb) c.[-6A>T;-4A>G;-3_105+167del] (2 SNVs + $\Delta$ 267pb)
Clon 73	1 banda	c.-5_30del ( $\Delta$ 35pb)
<b>Clones TALEN-<i>Fkrp</i></b>		
<b>Número de clon</b>	<b>Bandas clonadas</b>	<b>Cambios detectados</b>
Clon 1	1 banda	Sin mutación –silvestre
Clon 2	3 bandas	c.7_11delCTCACinsGG ( $\Delta$ 3pb) c.6_11delGCTCACinsA ( $\Delta$ 5pb) c.-6_43del ( $\Delta$ 49pb)
Clon 16	1 banda	Sin mutación – silvestre
Clon 29	1 banda	c.-4_14del ( $\Delta$ 18pb)
Clon 54	1 banda	c.-6_43del ( $\Delta$ 49pb)
Clon 66	2 bandas	c.9_10insATC (ins3pb) c.9_10insKP293940.1g.2764_2914 (ins150pb)
Clon 93	2 bandas	c.3_9del ( $\Delta$ 7pb) c.-15_19del ( $\Delta$ 34pb)

*Mutaciones en nomenclatura HUGO y en referencia a la secuencia ENSMUST00000128667  
ins, inserción; del ( $\Delta$ ), deleción; SNV, single nucleotide variation (variación en un único nucleótido)*

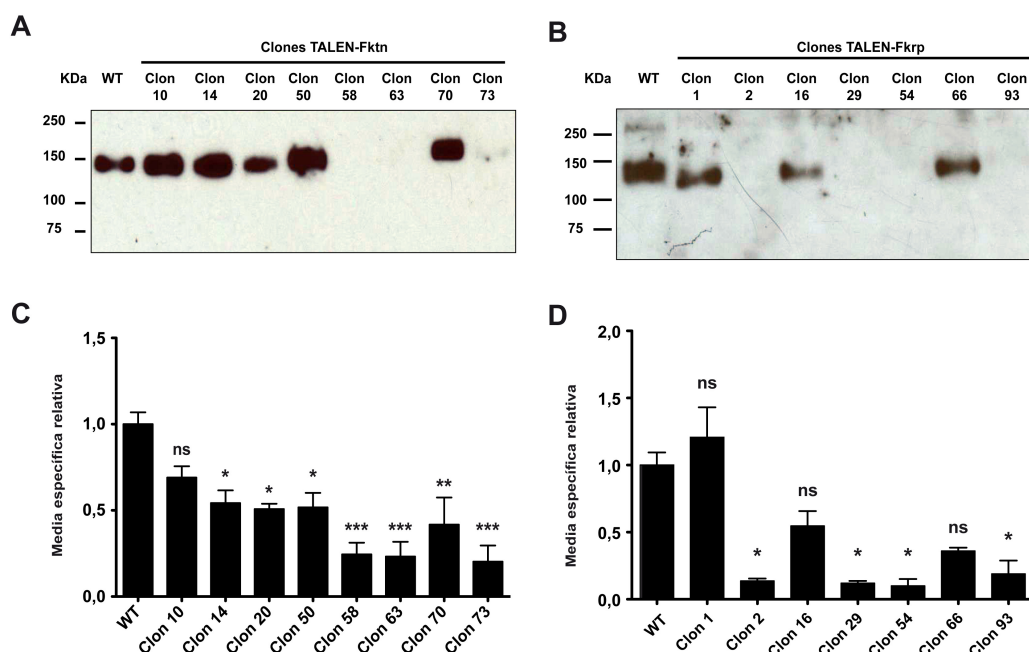
### 3.1.3. Análisis de la glicosilación del $\alpha$ -dystroglicano

Para analizar el efecto de estas mutaciones sobre la glicosilación del  $\alpha$ -DG se diferenciaron los clones seleccionados durante cuatro días, y posteriormente se realizó un WB con el anticuerpo IIH6 en extractos proteicos enriquecidos por WGA. Para los clones

TALEN-*Fktn* (**Figura 24A**) se comprobó que cinco de los ocho clones (clones 10, 14, 20, 50 y 70) seguían manteniendo la glicosilación de la misma manera que el control silvestre (WT) mientras que tres de ellos la habían perdido (clones 58, 63 y 73). Para estos clones *Fktn* concuerda que la presencia de al menos un alelo silvestre en su genoma mantiene la glicosilación del  $\alpha$ -DG.

En los clones TALEN-*Fkrp* (**Figura 24B**) solo tres de ellos mantuvieron la glicosilación del  $\alpha$ -DG (clones 1, 16 y 66), mientras que los otros cuatro (clones 2, 29, 54 y 93) no presentaron glicosilación. Destacó que el clon 66, que no presentaba alelo silvestre en su genoma (**Tabla 33**), sí tenía glicosilación del  $\alpha$ -DG, lo cual sería indicativo de que alguna de las mutaciones no sería patogénica.

Para comprobar el resultado del WB se puso a punto la detección de la glicosilación del  $\alpha$ -DG mediante citometría de flujo. Para este experimento se utilizaron los clones sin diferenciar, y la glicosilación se detectó utilizando el anticuerpo IIH6. Para los clones TALEN-*Fktn* (**Figura 24C**), se detectó un descenso en el valor medio de fluorescencia en todos los clones con respecto al silvestre (WT). El análisis estadístico por ANOVA de una vía determina que existe un efecto sobre el valor medio de la fluorescencia ( $F_{(8,27)} = 8,605$ ;  $p < 0,001$ ). El test *post hoc* de Bonferroni describe que la diferencia es más significativa en aquellos clones donde no se detectó la glicosilación por WB (clones 58, 63 y 73,  $p < 0,001$ ) que aquellos donde sí la detectó, a excepción del clon 10 que no presenta diferencias significativas con el silvestre (WT). Este mismo estudio en los clones *Fkrp* también muestra diferencias en las medias de fluorescencia (**Figura 24D**), siendo este efecto significativo al analizarlo por ANOVA de una vía ( $F_{(7,16)} = 17,423$ ;  $p < 0,001$ ). En este caso se utilizó la prueba *post hoc* de Games-Howell, y sólo se detectaron diferencias significativas en aquellos clones que no presentaron glicosilación en el estudio de WB (clones 2, 29, 54 y 93,  $p < 0,05$ ).



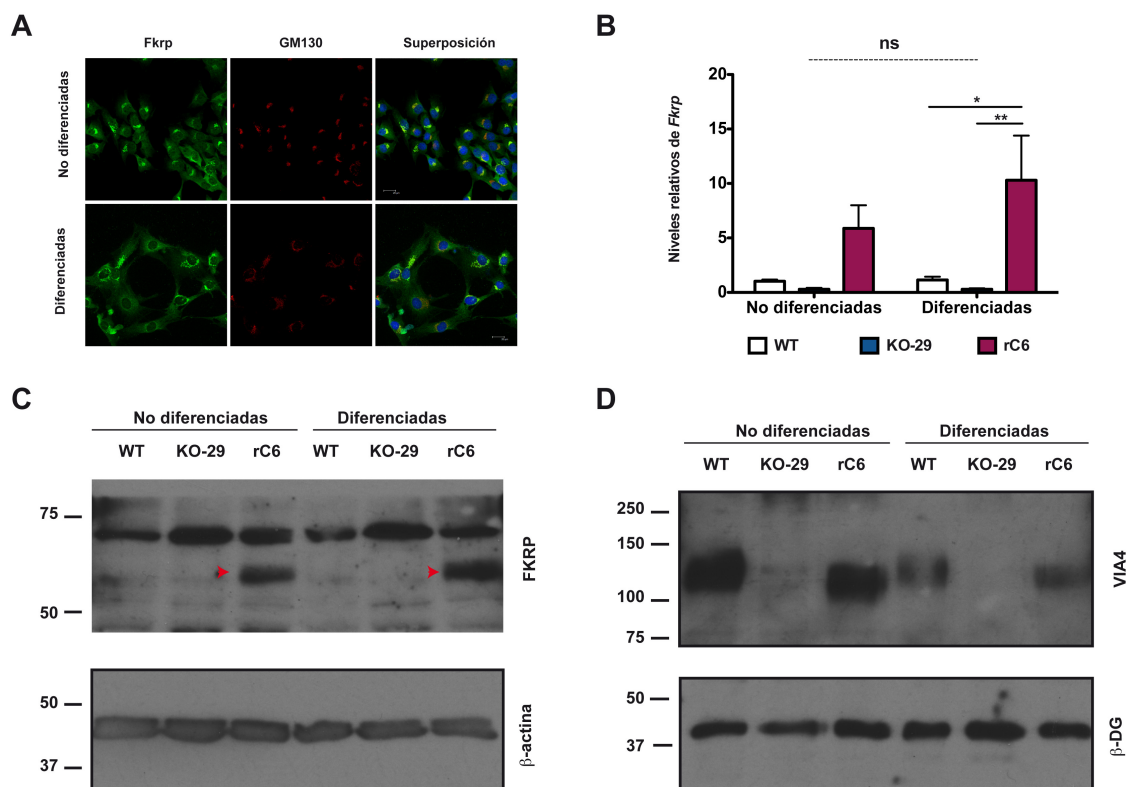
**Figura 24. Glicosilación del  $\alpha$ -DG en los clones TALEN-*Fktn* y *Fkrp*.** A y B, western blot en extractos enriquecidos por WGA de clones *Fktn* y *Fkrp* diferenciados, utilizando el anticuerpo IIH6. Se observó la ausencia de glicosilación en los clones *Fktn* 58, 63 y 73 (A), y en los clones *Fkrp* 2, 29, 54 y 93 (B). En el resto de clones el  $\alpha$ -DG coincide en altura con el del control silvestre (WT). C y D, estudio de citometría de flujo con el anticuerpo IIH6 para los clones TALEN-*Fktn* y *Fkrp* sin diferenciar. Se muestra el resultado de la media específica de la fluorescencia (media  $\pm$  SEM) obtenida en los ensayos (n=3). Para *Fktn* (C), todos los clones presentan menor intensidad de fluorescencia excepto el clon 10 donde no es significativo el descenso. Los clones 58, 63 y 73 presentan una disminución de la señal más significativa que el resto. Para los clones *Fkrp* (D), se repite una variación con respecto a la señal media del silvestre (WT); y la disminución solo es significativa para los clones 2, 29, 54 y 93. Estadística: para *Fktn*, ANOVA de dos vías con el test de Bonferroni, y para *Fkrp*, ANOVA de dos vías con el test de Games-Howell. ns, no significativo; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ .

### 3.2 Rescate fenotípico de líneas *knockout* en *Fktn* o *Fkrp*

Para comprobar que los datos observados por WB y citometría no eran debidos a la acción de las endonucleasas TALEN en otros puntos o bien a otros procesos no controlados, decidimos realizar el rescate fenotípico utilizándose para ello vectores recombinantes con la secuencias silvestres de *Fktn* o *Fkrp* unidas a un epítipo Flag.

Se transfectaron estas construcciones sobre los clones TALEN-*Fktn* 63 y TALEN-*Fkrp* 29 seleccionados como modelos mutantes. Mediante inmunocitofluorescencia (ICF) contra mFKRP comprobamos que estos primeros grupos transfectados tenían una sobreexpresión muy baja de la proteína (datos no mostrados). Por ello se decidió seleccionar y generar clones individuales para el estudio del rescate fenotípico. De la selección para el rescate fenotípico con mFKTN-Flag no se han obtenido clones que sobreexpresen la proteína y por lo tanto no se ha podido comprobar de momento el rescate fenotípico (datos no mostrados).

En cambio, para el rescate con mFKRP-Flag sí se encontró un clon C2C12 (clon rC6), que en un elevado porcentaje de células sobreexpresaba tanto el ARNm como la proteína mFKRP y el cual presentaba rescate de la glicosilación del  $\alpha$ -DG (**Figura 25**).



**Figura 25. Rescate de fenotipo del clon TALEN-Fkrp 29 en el clon rC6.** (A) Coinmunocitofluorescencia en el clon rC6 contra Fkrp y el marcador de AG GM130. Se observa la colocalización de ambas señales tanto en células no diferenciadas como diferenciadas. (B) qRT-PCR para *Fkrp* en células silvestres (WT), el clon KO TALEN-Fkrp 29 (KO-29) y el clon rC6 transfectado con FKRP-Flag, tanto en células no diferenciadas y diferenciadas. En los distintos experimentos (n=3) no se han observado diferencias significativas en los niveles de *Fkrp* en las células sin diferenciar (media  $\pm$  SEM). En las células diferenciadas sí que se observan diferencias significativas entre el WT y el KO-29 con el clon rC6, pero no entre ellos. No existen diferencias entre las células en el proceso de diferenciación (ns, línea discontinua superior). Estadística: ANOVA de dos vías con el test de Bonferroni. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ . (C) Western blot contra FKRP en células WT, KO-29 y rC6 no diferenciadas y diferenciadas. FKRP solo se detecta en el clon rC6 (punta de flecha), tanto en células no diferenciadas como diferenciadas. En la parte inferior se observa el control de carga para  $\beta$ -actina. (D) Western blot con el anticuerpo VIA4 en extractos WGA enriquecidos de células no diferenciadas y diferenciadas de células WT, KO-29 y clon rC6. Se detecta señal para VIA4 tanto en células WT como en el clon rC6 en ambas condiciones de diferenciación, si bien puede apreciarse menos señal en las diferenciadas y una bajada pequeña de peso molecular entre WT y rC6. Como control de carga se muestra al  $\beta$ -DG.

En este clon rC6 se observó mediante ICF que mFKRP se localizaba en el AG, tanto en células no diferenciadas como diferenciadas, al colocalizar con el marcador GM130 propio de este orgánulo (**Figura 25A**). La sobreexpresión también se comprobó mediante qPCR en células no diferenciadas y diferenciadas, observándose que el aumento significativo se produce al diferenciar el clon rC6 (**Figura 25B**). Mediante WB detectamos

únicamente la sobreexpresión de mFKRP en el clon rC6, mientras que no se detecta esa banda ni en el clon *knockout* 29 (KO-29) ni el silvestre (WT) (punta de flecha, **Figura 25C**). Por último, se comprobó que la sobreexpresión de mFKRP rescataba la glicosilación del  $\alpha$ -DG, ya que detectamos en el WB con el anticuerpo VIA4 la banda del  $\alpha$ -DG en los extractos enriquecidos del clon rC6 sin diferenciar y diferenciado. (**Figura 25D**).

### 3.3. Estudio glicoproteómico del distroglicano endógeno en clones *knockout* de *Fktn* y *Fkrp*

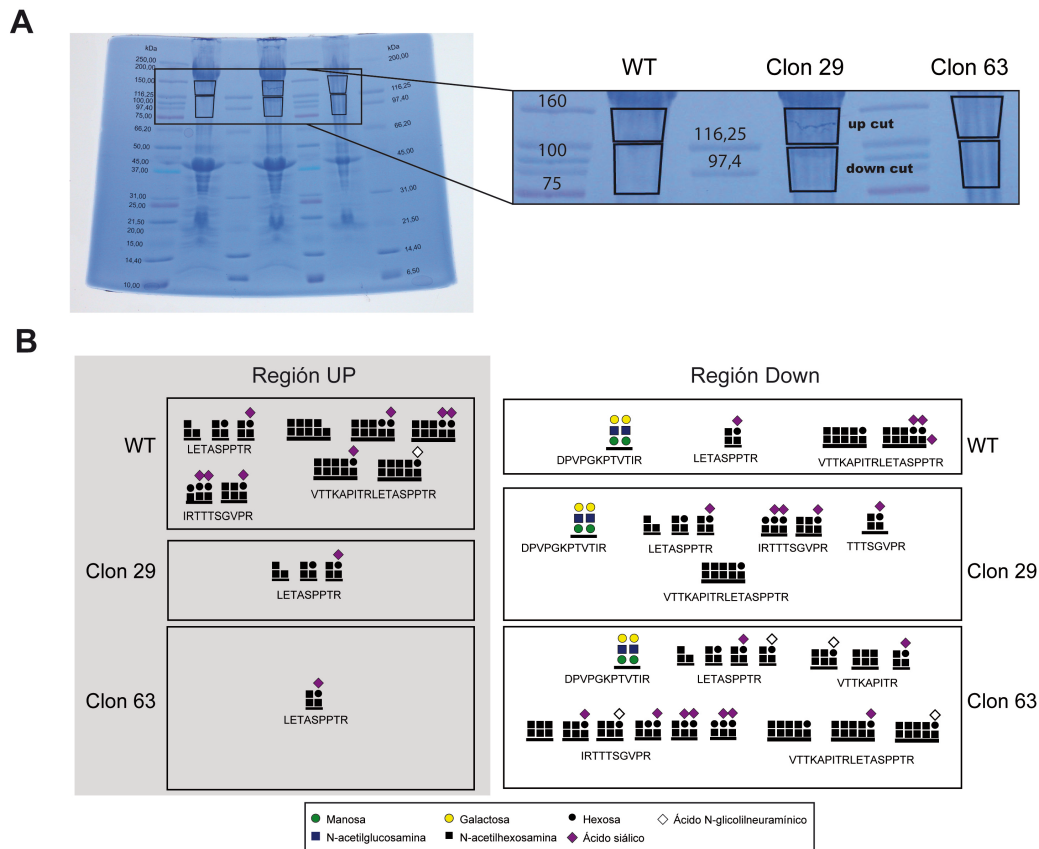
Uno de los objetivos principales de la generación de estas líneas era el estudio de las posibles diferencias en los residuos glicosílicos con respecto al control silvestre. Con anterioridad, nuestro laboratorio, en colaboración con el laboratorio del Dr. Göran Larson (Universidad de Gothenburg), había determinado los residuos glicosílicos de la línea C2C12 silvestre (Gomez Toledo *et al.*, 2012).

Para el análisis de los residuos glicosílicos se utilizaron grandes cantidades de extracto enriquecido por WGA de la línea C2C12 silvestre (WT) y de los clones KO TALEN-*Fktn* 63 y TALEN-*Fkrp* 29 diferenciados durante cuatro días. Para el análisis glicoproteómico se seleccionaron dos regiones por peso molecular (**Figura 26A**): zona *up cut* comprendida entre 160 y 116 kDa, que debería contener el  $\alpha$ -DG glicosilado, y una región *down cut* comprendida entre 116 y 75 kDa, que contendría formas de menor peso molecular del  $\alpha$ -DG glicosilado. Estas bandas extraídas del gel fueron enviadas al Dr. Larson para el análisis de los péptidos glicosilados mediante espectrometría de masas en tándem basada en disociación inducida por colisión CID-MS/MS ( $MS^2$ ) y CID-MS/MS/MS ( $MS^3$ ).

En la **Figura 26B** se muestran los resultados obtenidos en este análisis. Se observa que, para la región *up* de las tres muestras estudiadas, el único péptido en común es el que comprende a los residuos 469-477 (LETASPPTR). Los resultados para los residuos glicosílicos son los mismos entre el WT y el clon 29, mientras que en el clon 63 solo se ha encontrado uno de los patrones de glicosilación. En la muestra WT también se han encontrado péptidos glicosilados que se corresponden con los aminoácidos 460-477 (VTTKAPITRLETASPPTR) y con el péptido 478-487 (IRTTTSGVPR). En los tres casos el tipo de residuos encontrados son del *core* iniciado por HexNAc-O-Ser/Thr.

Por su parte, en los resultados de la región *down* se observa que en las tres muestras se encuentra el péptido que incluye los aminoácidos 358-369 (DPVPGKPTVTIR). Éste corresponde con una estructura *core* iniciada por Hex-O-Ser/Thr, que podría corresponder con el *core* M1 (Introducción). En cuanto a los péptidos con estructura *core* mucina, del tipo HexNAc-O-Ser/Thr, se aprecia que aparecen más péptidos en los clones que en el silvestre. Los péptidos 460-477 (VTTKAPITRLETASPPTR) y 478-487 (IRTTTSGVPR) que no

aparecieron en la región *up*, sí lo hacen en la región *down* de los clones, apareciendo el primero de ellos también en el control silvestre. En las tres muestras aparece de nuevo el péptido 469-77 (LETASPPTR). En cuanto a los residuos detectados sobre los péptidos, no se aprecia una clara diferencia entre ellos, a excepción de algunas formas de los residuos terminales NeuAc o Neu5Gc.



**Figura 26. Análisis glicoproteómico de células C2C12 silvestre y clones TALEN-*Fkrp* 29 y TALEN-*Fktn* 63.** (A) Fotografía del gel de poliacrilamida utilizado para la obtención de las bandas de las que posteriormente se identificarían los residuos glicosílicos. A la derecha se muestra una imagen aumentada de la región seleccionada para las bandas *up* y *down*, y se destacan los marcadores de peso molecular. (B) Resultados obtenidos del análisis glicoproteómico de las regiones *up* y *down*. A la izquierda resultados obtenidos de la región *up*, donde se observa que en el control silvestre (WT) se han detectado más péptidos glicosilados que en los clones 29 y 63. A la derecha los resultados obtenidos de la región *down*. En esta región se ha detectado el péptido O-manosilado. El resto de péptidos son similares entre las tres muestras estudiadas.

### 3.4. Estudio transcriptómico. RNAseq de líneas KO-*Fktn* y KO-*Fkrp*

Para aproximarnos al papel que pueden tener mFKTN y/o mFKRP en el control de la expresión génica se decidió realizar la secuenciación completa de todos los ARNm (RNAseq) de las dos líneas KO y de la línea control silvestre.

Para ello se obtuvo el ARN total de las células C2C12 silvestres y de los clones TALEN-*Fktn* 63 y TALEN-*Fkrp* 29, todas ellas diferenciadas durante cuatro días. El estudio fue realizado por la empresa Sistemas Genómicos (Valencia). Los resultados obtenidos identificaron hasta 448 genes diferencialmente expresados en el clon KO-*Fktn* 63 frente al control silvestre, y 1.565 genes en el caso del clon KO-*Fkrp* 29.

Debido al elevado número de genes encontrados diferencialmente expresados en estos clones con respecto al silvestre, se decidió continuar de momento con uno solo de los clones TALEN. Se seleccionó el clon KO-*Fkrp*, principalmente por ser el clon con mayor número de genes diferencialmente expresados y también al ser el clon que habíamos conseguido rescatar fenotípicamente.

#### **3.4.1. Selección de genes en el clon TALEN-KO 29 de *Fkrp***

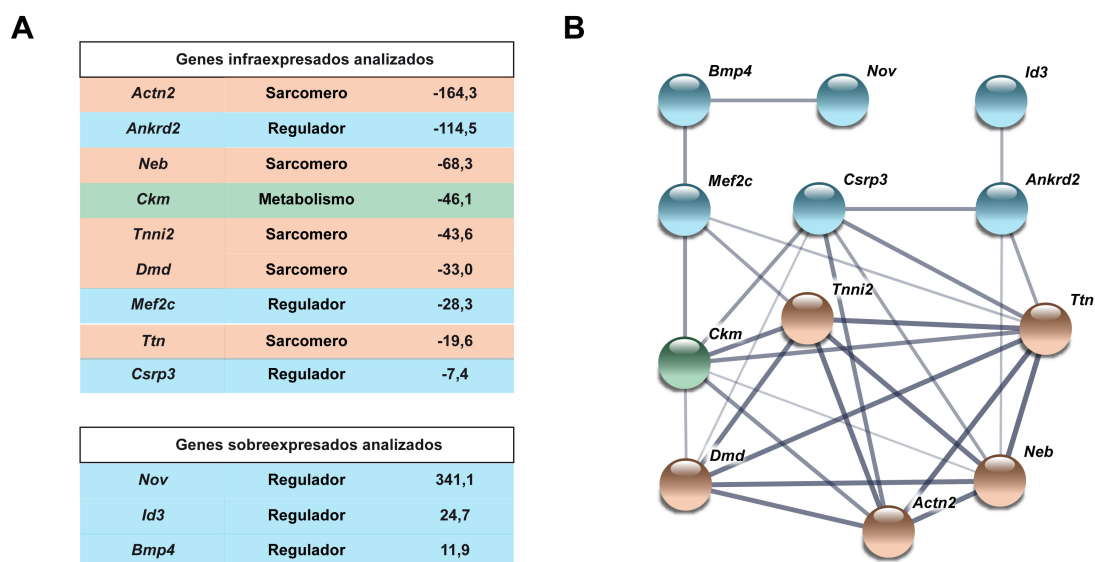
El análisis por RNAseq, como se ha comentado, detectó 1.565 genes diferencialmente expresados, de los cuales 1.003 se encuentran infraexpresados con respecto al silvestre y 562 sobreexpresados. Para la selección de genes a estudio inicialmente utilizamos solo los genes infraexpresados 20 veces por debajo del nivel del silvestre (141 genes, **Anexo I Tabla 38**), mientras que para el análisis de genes sobreexpresados seleccionamos aquellos cuyos niveles superaban en 10 veces al silvestre (24 genes, **Anexo I Tabla 39**). Esta lista de genes se introdujo en la base de datos STRING, la cual nos permite observar de manera sencilla redes de interacción basadas en diferentes parámetros (interacciones, importancia de la interacción, homología, publicaciones,...).

Este primer análisis reveló una importante relación de estos genes con el proceso de diferenciación muscular, y así mismo también con genes relacionados con proteínas sarcoméricas. Este resultado nos llevó a plantear la hipótesis de una posible afectación del proceso de diferenciación muscular, motivo por el cual centramos nuestro primer estudio en ella. Decidimos en primer lugar analizar un grupo pequeño de genes que posteriormente iríamos aumentando con el resto de genes incluidos en esos grupos. De entre los genes detectados, seleccionamos 10 genes: *Actn2*, *Ankrd2*, *Neb*, *Ckm*, *Tnni2*, *Dmd*, *Mef2c*, *Nov*, *Id3* y *Bmp4*. Posteriormente hemos incluido también *Csrp3* y *Ttn* (**Anexo I Tabla 40**), ambos también relacionados con la diferenciación o con proteínas sarcoméricas, respectivamente, aunque no cumpliesen el criterio inicial. Esta inclusión *a posteriori* se hizo debido al alto número de relaciones que se observaron con los 10 genes seleccionados en un estudio más amplio en STRING (datos no mostrados).

De los 12 genes seleccionados, 9 están infraexpresados y 3 sobreexpresados (**Figura 27A**). Además, de todos ellos 5 codifican proteínas sarcoméricas, 6 reguladores del proceso de diferenciación y 1 proteína del metabolismo (**Figura 27A**). Estos 12 genes



fueron reintroducidos en STRING para obtener la red de interacción entre ellos (**Figura 27B**). A continuación se comprobó sobre las mismas muestras utilizadas en el RNAseq que en estos genes seleccionados se obtenía la misma variación detectada por el análisis masivo. En ninguno de los casos se observó diferencia con el experimento de RNAseq (datos no mostrados).



**Figura 27. Genes seleccionados e interacción STRING entre ellos.** (A) Genes infraexpresados y sobreexpresados seleccionados para su estudio. Se muestra el valor de variación (*Fold*) observado en RNAseq entre las células silvestres y el clon TALEN-Fkrp 29 diferenciados. En naranja se muestran los genes que codifican proteínas sarcoméricas; en azul, genes reguladores de la diferenciación; y en verde, genes de proteínas del metabolismo. (B) Interacciones encontradas en la base de datos STRING entre los genes seleccionados. El grosor de la línea indica la fuerza de la interacción, siendo mayor cuanto más oscura es la misma.

### 3.4.2. Rescate de la expresión génica

Al igual que para la glicosilación de  $\alpha$ -DG, nos preguntamos en primer lugar si la sobreexpresión de mFKRP en este KO recuperaba los niveles de expresión de los genes afectados. Utilizando la línea C2C12 silvestre, el clon TALEN-Fkrp 29 (KO-29) y el clon rescatado rC6, llevamos a cabo experimentos de qRT-PCR para estos genes, tanto en células sin diferenciar como diferenciadas durante cuatro días.

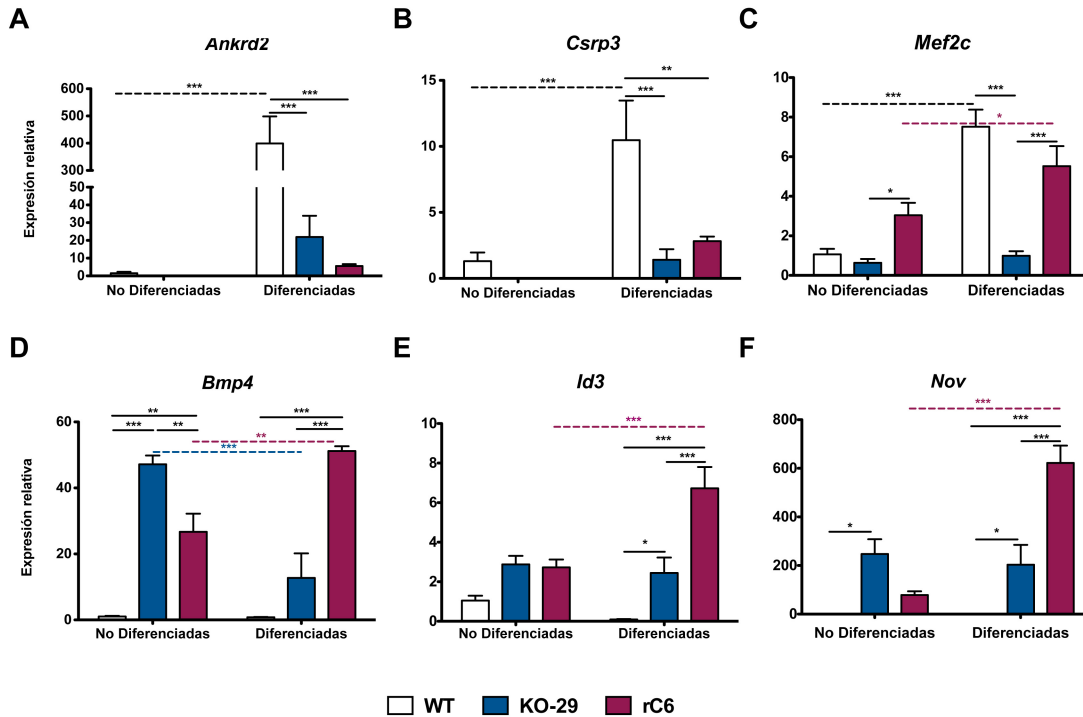
En el análisis del primero de los grupos, los reguladores de la diferenciación muscular (**Figura 28**), el análisis estadístico por ANOVA de dos vías ha demostrado la existencia de interacción entre los genotipos analizados y el proceso de diferenciación en los 6 genes: *Ankrd2* ( $F_{(2,12)}=14,69$ ;  $p=0,0006$ ), *Bmp4* ( $F_{(2,12)}=27,72$ ;  $p<0,0001$ ), *Csrp3* ( $F_{(2,12)}=5,05$ ;  $p=0,0257$ ), *Id3* ( $F_{(2,12)}=10,18$ ;  $p=0,0026$ ), *Mef2c* ( $F_{(2,12)}=12,33$ ;  $p=0,0012$ ) y *Nov* ( $F_{(2,12)}=20,60$ ;  $p=0,0001$ ). Este dato nos indica de inicio que el efecto observado en la



expresión de estos genes en condiciones de no diferenciación o de diferenciación no son las mismas entre los diferentes genotipos.

Los análisis de comparaciones múltiples nos permiten observar cómo son esas diferencias, y podemos decir que, con excepción de *Mef2c*, en ninguno de los otros genes se recuperaron los niveles de la línea C2C12 silvestre (**Figura 28**). Así, se observa en *Ankrd2* (**Figura 28A**) y *Csrp3* (**Figura 28B**), que la diferenciación causó un aumento significativo en el nivel de expresión de estos genes en la línea silvestre, pero esto no sucede ni en el clon KO-29 ni en el clon rC6, lo cual causa diferencias significativas en las células diferenciadas. En el caso de *Mef2c* (**Figura 28C**) observamos que en las células no diferenciadas hay un aumento significativo de los niveles en el clon rC6 con respecto al clon KO-29, pero no se observa diferencia significativa con la línea silvestre. Al diferenciar las células, tanto en la línea silvestre como en el clon rC6, se observa un aumento significativo de los niveles de *Mef2c*, sin que exista diferencia estadística entre ellos, al contrario que en el clon KO-29 donde los niveles no varían al diferenciar, y son significativamente menores que con los otros genotipos.

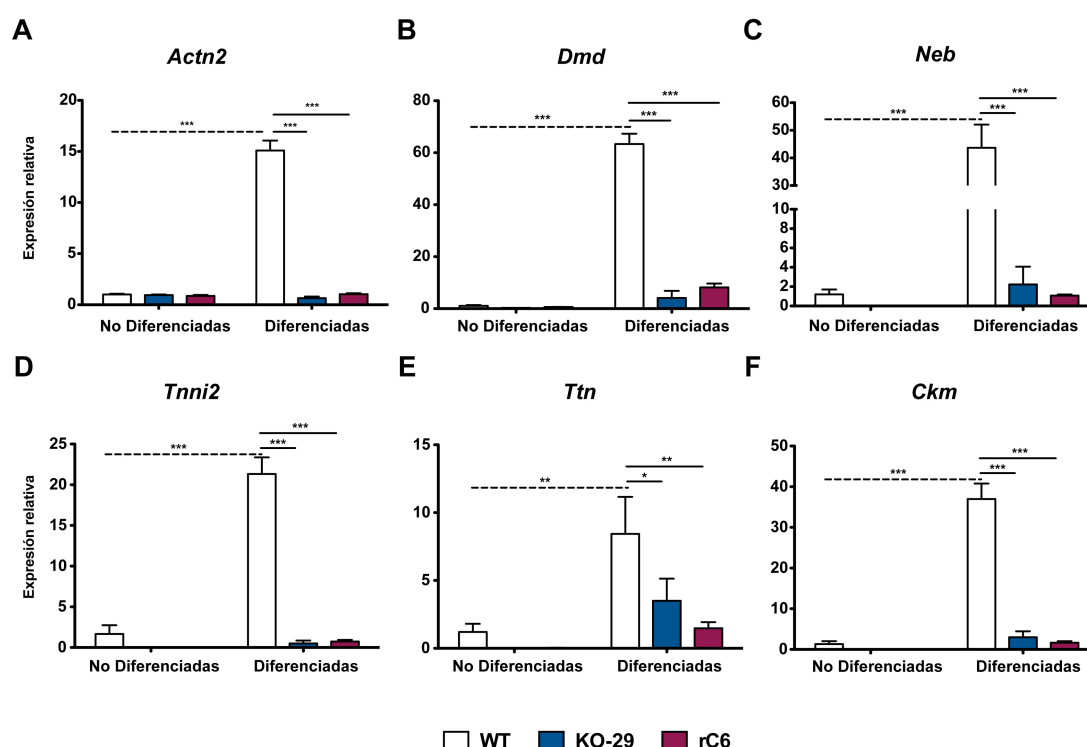
En los tres genes restantes no se observó un aumento significativo en la línea silvestre al diferenciarla (**Figuras 28D-F**). En *Bmp4* (**Figura 28D**), sí que existían diferencias significativas entre los tres genotipos en las células sin diferenciar, siendo el clon KO-29 el que mayor nivel de *Bmp4* tenía. Sin embargo, con la diferenciación, los niveles en este clon KO-29 se reducen significativamente, mientras que en el clon rC6 aumentan significativamente, teniendo en las células diferenciadas el mayor nivel de expresión en el clon rC6 y variaciones significativas entre los tres genotipos. Para *Id3* (**Figura 28E**) no observamos diferencias en la condición no diferenciada, pero sí un aumento significativo de los niveles al diferenciar el clon rC6. Sin embargo, en las células ya diferenciadas sí que existían diferencias significativas entre los tres genotipos para este gen. Por último, en el gen *Nov* (**Figura 28F**) teníamos de inicio una diferencia significativa entre la línea silvestre y el KO-29, que se mantuvo al diferenciar las células. El aumento más significativo se produce al diferenciar el clon rC6, el cual finalmente mantiene niveles muy superiores y significativos con respecto a los otros dos genotipos.



**Figura 28. Rescate del fenotipo transcriptómico de genes reguladores.** Se muestran los niveles de expresión (media +/- SEM) obtenidos para los diferentes genes en estos análisis (n=3). Se analizan los niveles en células no diferenciadas y diferenciadas de C2C12 silvestre (WT), clon TALEN-*Fkrp* 29 y clon rescatado C6 (rC6). Con línea discontinua se muestran las diferencias significativas existentes dentro del mismo genotipo al diferenciar. Con línea continua las diferencias entre genotipos en cada una de las condiciones de diferenciación. En los genes analizados *Ankrd2* (A) y *Csrp3* (B) se observa un aumento significativo al diferenciar las células WT, así como diferencias significativas entre WT y los clones KO-29 y rC6, pero no hay diferencias significativas entre estos dos últimos. En *Mef2c* (C) hay un aumento significativo al diferenciar las células WT y rC6. En el grupo de células diferenciadas existen diferencias significativas entre el clon KO-29 y los otros dos genotipos, mientras que en las no diferenciadas solo se aprecian diferencias entre los clones KO-29 y rC6. Para *Bmp4* (D) encontramos diferencias significativas al diferenciar las células KO-29 (donde descienden los niveles) y en rC6 (donde aumentan). Dentro de la condición de células no diferenciadas existe una expresión significativamente diferente entre los tres genotipos, mientras que en la condición de diferenciación existen diferencias significativas entre rC6 y los otros dos genotipos, pero no entre WT y KO-29. En los dos últimos genes, *Id3* (E) y *Nov* (F), los niveles aumentan al diferenciar las células rC6, y existen diferencias entre los tres genotipos en la condición de células diferenciadas. En el gen *Nov* (F) también existen diferencias significativas entre WT y KO-29 en la condición no diferenciada. Estadística: ANOVA de dos vías con test de Bonferroni. \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001.

En el segundo grupo de genes, en el que se incluyen los que codifican proteínas sarcoméricas y también al gen metabólico *Ckm*, de nuevo no hemos encontrado recuperación del fenotipo de expresión silvestre (Figura 29). Al igual que en el anterior grupo, el análisis por ANOVA de dos vías ha encontrado interacción en todos los genes con excepción de *Ttn*: *Actn2* ( $F_{(2,12)}=200,87$ ;  $p<0,0001$ ), *Dmd* ( $F_{(2,12)}=125,49$ ;  $p<0,0001$ ), *Neb* ( $F_{(2,12)}=22,41$ ;  $p<0,0001$ ), *Tnni2* ( $F_{(2,12)}=66,67$ ;  $p<0,0001$ ) y *Ckm* ( $F_{(2,12)}=64,21$ ;  $p<0,0001$ ). El análisis de comparaciones múltiples realizado mostró un aumento muy significativo de los

niveles de expresión en todos los genes de este grupo al diferenciar la línea silvestre, pero este aumento no se produjo ni el clon KO-29 ni el clon rC6. Esto provoca que en la condición de diferenciación se den diferencias significativas entre el genotipo silvestre y los otros dos genotipos, no existiendo entre estos dos últimos diferencias apreciables en los niveles de expresión estos genes (**Figura 29A-F**).

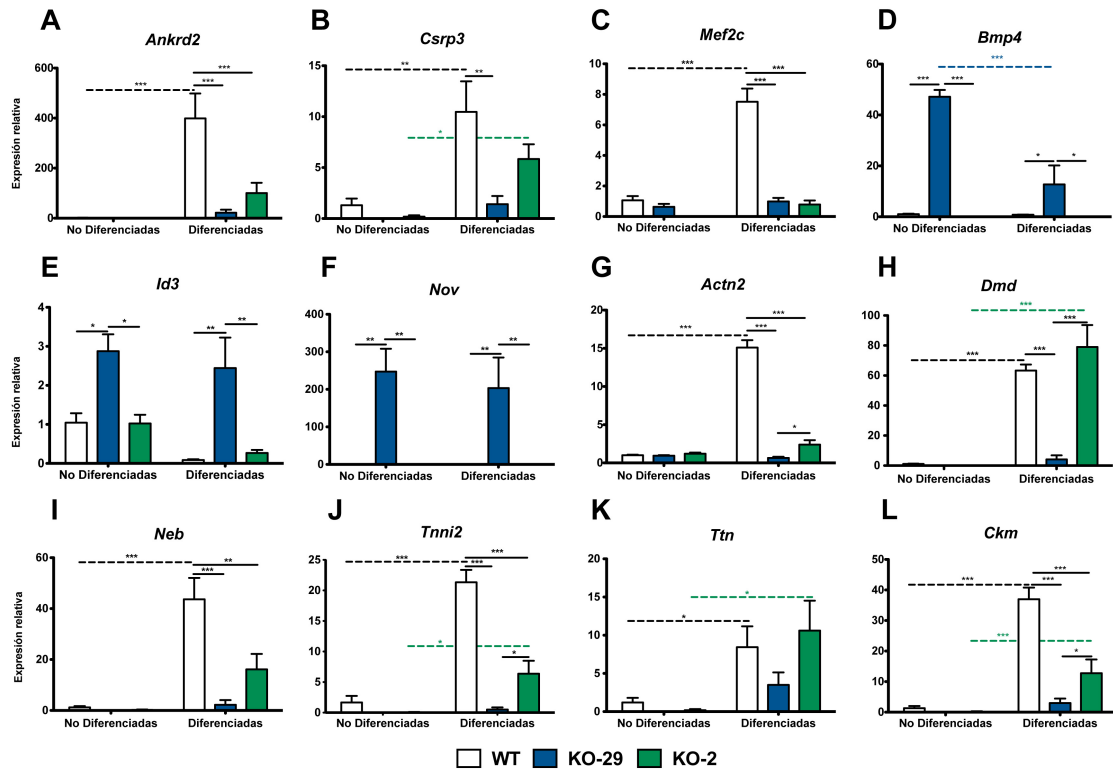


**Figura 29. Rescate del fenotipo transcriptómico de genes sarcoméricos y metabólicos.** Se muestran los niveles de expresión (media +/- SEM) obtenidos para los diferentes genes en estos análisis (n=3). Se analizan los niveles en células no diferenciadas y diferenciadas de C2C12 silvestre (WT), clon 29 TALEN-*Fkrf* y clon rescatado 6 (rC6). Con línea discontinua se muestran las diferencias significativas existentes dentro del mismo genotipo al diferenciar. Con línea continua las diferencias entre genotipos en cada una de las condiciones de diferenciación. En los genes analizados *Actn2* (A), *Dmd* (B), *Neb* (C), *Tnni2* (D), *Ttn* (E) y *Ckm* (F) se observan solo diferencias significativas al diferenciar el genotipo WT. Dentro de las células diferenciadas se aprecian variaciones de distinta significancia estadística entre el WT con los genotipos KO-29 y rC6, pero no hay diferencias entre estos dos últimos. Estadística: ANOVA de dos vías con test de Bonferroni. \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001.

### 3.4.3. Análisis del efecto clonal

Para evaluar si los datos obtenidos para el clon TALEN-*Fkrf* 29 (KO-29) se reproducían en otros clones KO se decidió estudiar la expresión de estos mismos genes en clon TALEN-*Fkrf* 2 (KO-2), el cual también mostraba ausencia de glicosilación del  $\alpha$ -DG.

Comparando con los datos anteriormente obtenidos para las células C2C12 silvestres y el clon KO-29, podemos observar que existen diferencias en la expresión de los genes seleccionados entre los clones KO. No se observaron diferencias entre los clones en



**Figura 30. Niveles de expresión de genes de diferenciación entre clones *knockouts* de *Fkrp*.** Se muestran los niveles de expresión (media +/- SEM) obtenidos para los diferentes genes en estos análisis (n=3). Se analizan los niveles en células no diferenciadas y diferenciadas de C2C12 silvestre (WT), clon 29 TALEN-*Fkrp* y clon rescatado 6 (rC6). Con línea discontinua se muestran las diferencias significativas existentes dentro del mismo genotipo al diferenciar. Con línea continua las diferencias entre genotipos en cada una de las condiciones de diferenciación. Los genes analizados comprenden genes reguladores de la diferenciación como *Ankrd2* (A), *Csrp3* (B), *Mef2c* (C), *Bmp4* (D), *Id3* (E) y *Nov* (F); genes de proteínas sarcoméricas como *Actn2* (G), *Dmd* (H), *Neb* (I), *Tnni2* (J) y *Ttn* (K); y el gen metabólico *Ckm* (L). Los niveles de expresión de estos genes en células no diferenciadas permanecen iguales a excepción de D, E y F, en donde el clon KO-29 presenta niveles significativamente superiores al resto de genotipos. En todos los genes menos en D, E y F las células WT aumentan sus niveles significativamente al diferenciar. El clon KO-29 solo los disminuye en D al diferenciar, mientras que el clon KO-2 aumenta los niveles en B, H, J, K y L al diferenciar, siendo más similar al WT que lo es el clon KO-29. En las células diferenciadas se aprecian diferencias significativas en todos los genes entre el clon WT y el clon KO-29. Al contrario, entre el WT y el KO-2 solo se ven diferencias en los genes A, C, G, I, J y L. Estos resultados muestran importantes diferencias en los genes seleccionados entre los distintos clones TALEN-*Fkrp*. Estadística: ANOVA de dos vías con test de Bonferroni. \*, p<0,05; \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001.

los genes reguladores *Ankrd2* (Figura 30A), *Csrp3* (Figura 30B) o *Mef2c* (Figura 30C), manteniéndose en todos ellos una diferencia significativa con el genotipo silvestre en las células diferenciadas. En cambio, sí que se han observado diferencias significativas en el clon KO-2 con respecto al clon KO-29 en los genes reguladores *Bmp4* (Figura 30D), *Id3* (Figura 30E) y *Nov* (Figura 30F), donde este clon KO-2 presenta niveles similares al silvestre. En cuanto a los genes que codifican proteínas sarcoméricas, se siguen observando cambios con respecto al genotipo silvestre en los genes *Actn2* (Figura 30G), *Neb* (Figura 30I) y *Tnni2* (Figura 30J), pero no en los genes *Dmd* (Figura 30H) o en *Ttn* (Figura 30K).

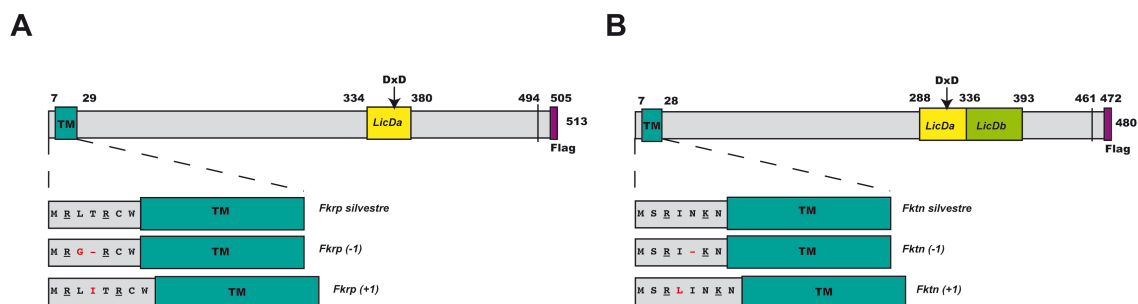
Aún existiendo estos cambios con respecto al genotipo silvestre, el clon KO-2 presenta diferencias significativas con respecto al clon KO-29, presentando siempre niveles mayores en los genes *Actn2*, *Dmd* y *Tnni2*. En cuanto al último de los genes, *Ckm* (**Figura 30L**), siguen existiendo diferencias de expresión entre el genotipo silvestre y el clon KO-2, pero también los niveles de este último son mayores en células diferenciadas con respecto al clon KO-29. El proceso de diferenciación también ha causado un aumento significativo de los niveles de expresión en el clon KO-2 para los genes *Csrp3* (**Figura 30B**), *Dmd* (**Figura 30H**), *Tnni2* (**Figura 30J**), *Ttn* (**Figura 30K**) y *Ckm* (**Figura 30L**), los cuales no se observan en el caso del clon KO-29.

### 3.5. Estudio de la señal de localización de mFKTN y mFKRP

#### 3.5.1. Generación de construcciones plasmídicas

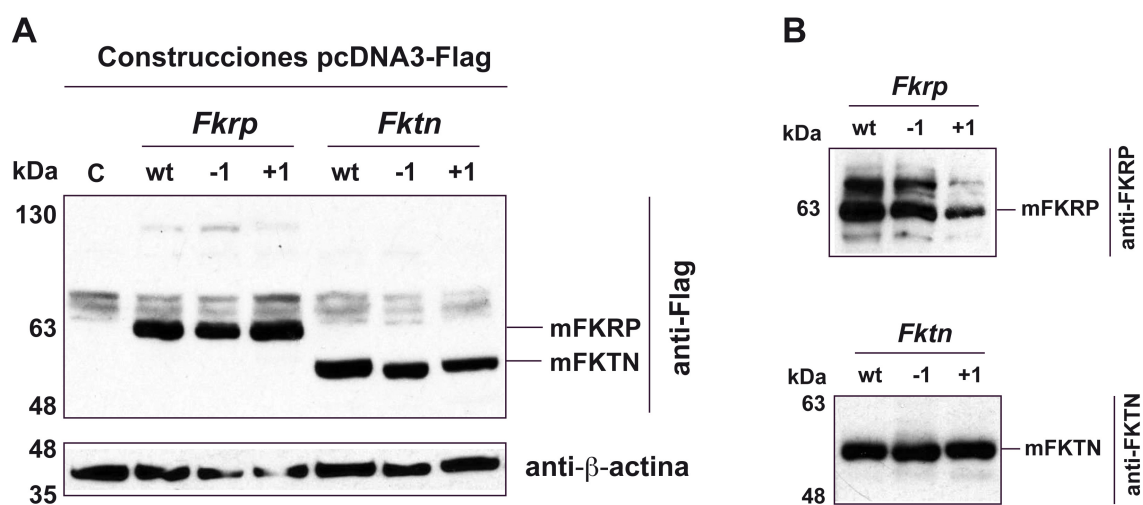
El análisis de las mutaciones generadas en clones TALEN-*Fkrp* reveló dos mutaciones interesantes: en el clon 2 se detectó una mutación de delección de 3 pb, que conlleva la pérdida de dos aminoácidos (leucina y treonina) y la aparición de uno (glicina), todo ello manteniendo la pauta (*Fkrp*(-1), **Figura 31A**). Por otro lado, en el clon 66, se detectó una mutación consistente en la inserción de 3 pb, que daría lugar a la inserción de una (isoleucina), también manteniendo la pauta (*Fkrp*(+1), **Figura 31A**). En el caso del clon 2 la glicosilación del  $\alpha$ -DG se ve afectada, mientras que en el clon 66 la glicosilación es todavía detectable (**Figura 24B**).

Ambas mutaciones se localizan en la región inmediatamente anterior al dominio transmembrana (TM), y entre dos residuos de arginina (RxxR). Estos residuos han sido descritos como necesarios para la localización de la proteína FKRP en el AG y se postula que su función sería la misma para otras glicosiltransferasas, entre ellas FKTN que posee en esta misma región un dominio RxxK, también de aminoácidos básicos (Esapa *et al.*, 2002). Por ello revisamos también las mutaciones de los clones TALEN-*Fktn* en búsqueda de mutaciones semejantes a las halladas en los clones TALEN-*Fkrp*. Para el caso de la delección de un aminoácido encontramos una mutación en el clon 70, que causaba la pérdida del aminoácido asparagina en esta región (*Fktn*(-1), (**Figura 31B**), manteniendo la pauta de lectura. La presencia de una banda silvestre de  $\alpha$ -DG en este clon hacía que su glicosilación no se viese afectada (**Figura 24A**). En cuanto a la mutación de inserción, no se encontró ninguna mutación en los clones estudiados que la imitara, y por ello, para completar el estudio, se decidió generar esta mutación mediante mutagénesis dirigida sobre la secuencia silvestre, insertando un aminoácido leucina en esta región (*Fktn*(+1), (**Figura 31B**).



**Figura 31. Construcciones plasmídicas de *Fkrp* y *Fktn* utilizadas para el estudio de la señal de localización.** (A) Construcciones para el gen *Fkrp*. En la parte superior se observa un esquema de la proteína donde se detallan las posiciones de cada uno de los diferentes dominios. En la parte inferior se amplía la región inmediatamente anterior al dominio transmembrana, y se detallan las mutaciones clonadas para las construcciones *Fkrp*(-1) y *Fkrp*(+1). (B) Construcciones para el gen *Fktn*. Al igual que en A, se expone un diagrama con los diferentes dominios y se amplía la región pre-transmembrana donde se detallan las mutaciones para *Fktn*, clonada *Fktn*(-1) o generada (*Fktn*(+1)). TM, transmembrana; LicDa y LicDb, dominios de homología con LicD; DxD, motivo aspártico-X-aspártico común en glicosiltransferasas; Flag, epítipo de reconocimiento.

Estas construcciones se transfectaron en la línea celular HEK293T, y se comprobó que ninguna presenta problemas de expresión tanto al detectarse por su epítipo Flag (**Figura 32A**) como con anticuerpos contra la proteína (**Figura 32B**).



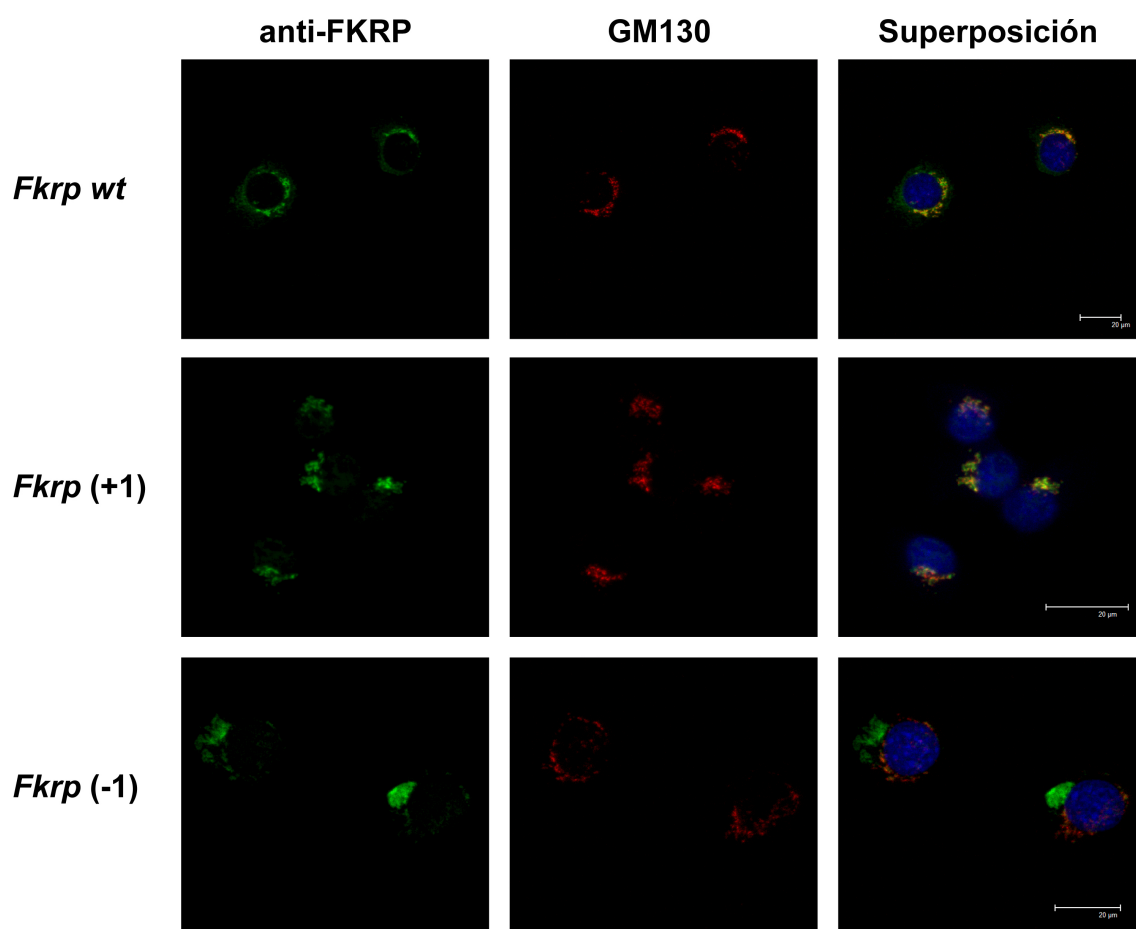
**Figura 32. Expresión de *Fktn* y *Fkrp* silvestres y de sus construcciones mutantes en células HEK293T.** (A) *Western blot* contra el epítipo Flag donde se detectan las construcciones *Fktn* y *Fkrp* silvestres (wt), de delección de 1 aa (-1) e inserción de 1 aa (+1). Se detecta la expresión en todas las construcciones y una diferencia en el tamaño entre FKTN y FKTR. C, control sin transfección. Como control de carga se analiza la  $\beta$ -actina. (B) *Western blot* con los anticuerpos contra la secuencia proteica de FKRP (izquierda) y FKTN (derecha). Se detectan las señales en todos los carriles y a la misma altura que en el experimento anterior.

### 3.5.2. Estudio de la localización subcelular de las mutaciones en *Fkrp*

Una vez comprobado que las diferentes construcciones se expresan correctamente, se realizó el estudio de localización subcelular de las proteínas mediante inmunocitofluorescencia. Para este estudio se transfectaron las construcciones en células C2C12 silvestres. Para las construcciones de inserción o delección de *Fktn* no se han podido obtener resultados al no observarse células que sobreexpresen las proteínas (datos no mostrados). En cambio para *Fkrp*, aunque el porcentaje de células es muy bajo, sí se han observado algunas células que sobreexpresan las tres construcciones. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

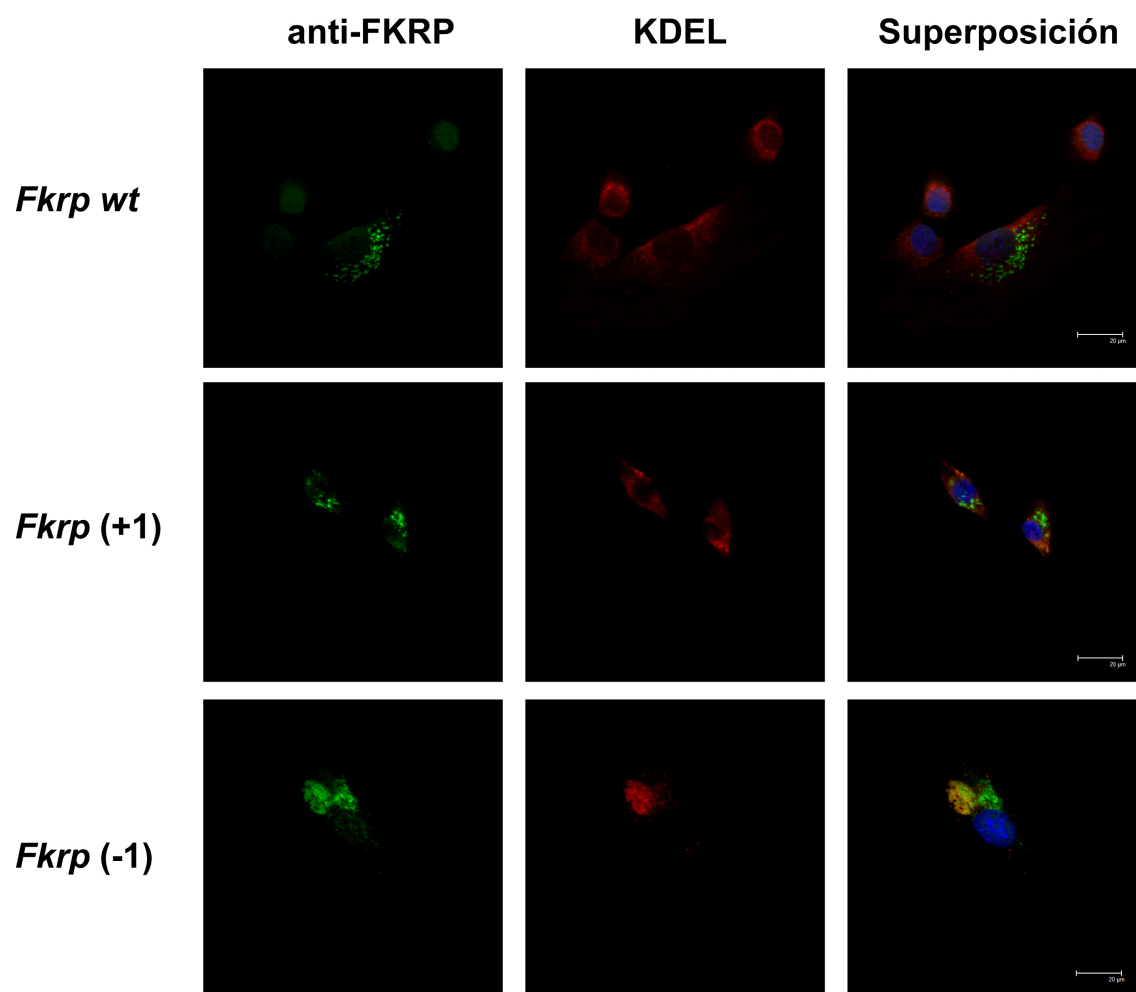
En el primero de los estudios se comprueba la colocalización de las construcciones con el marcador del AG, GM130. Tanto mFKRP como mFKTN están descritas como proteínas residentes de este orgánulo (Esapa *et al.*, 2002). Los resultados obtenidos muestran que, tanto en células transfectadas con la construcción silvestre (*wt*) como con la construcción de inserción de un aminoácido (+1), la señal contra mFKRP colocaliza con la señal del marcador del AG, GM130 (**Figura 33**). En cambio, para la construcción de delección de un aminoácido (-1), la señal no colocaliza con GM130, apareciendo en su lugar una acumulación en otro compartimento de la célula próximo al AG (**Figura 33**).

Quisimos comprobar si esa deslocalización de la señal de *Fkrp*(-1) coincidiría con una acumulación en el orgánulo inmediatamente anterior, el retículo endoplasmático (RE). Para ello se realizaron nuevas inmunocitofluorescencias contra las tres construcciones, pero utilizando el marcador de RE, KDEL. Los resultados mostraron que, al contrario que en el análisis anterior, las construcciones silvestres (*wt*) y de inserción (+1) no colocalizan con la señal KDEL en el RE (**Figura 34**). Por su parte, la señal anteriormente observada para la delección sí que localiza, al menos en parte, con la señal KDEL, aunque se observó que no toda ella se localizaba en el RE, sino que parte de ella aparecía en otro lugar (**Figura 34**).



**Figura 33. Coinmunohistofluorescencia entre GM130 (aparato de Golgi) y las diferentes construcciones de *Fkrp* en células C2C12 silvestres.** En este estudio se observa cómo la sobreexpresión de las construcciones silvestres (*Fkrp wt*), de delección de 1 aa (*Fkrp (-1)*) y de inserción de un 1 aa (*Fkrp (+1)*) son detectables por el anticuerpo anti-FKRP (primera columna). El marcador de aparato de Golgi GM130 se observa en todas las células (segunda columna). La colocalización de la señal solo parece producirse para las construcciones silvestres y de inserción, mientras que para la delección esta señal no colocaliza con GM130, sino que parece acumularse en otro punto de la célula. Escala 20 μm en todas las imágenes.





**Figura 34. Coinmunohistofluorescencia entre KDEL (RE) y las diferentes construcciones de *Fkrp* en células C2C12 silvestres.** En este estudio se observa cómo la sobreexpresión de las construcciones silvestres (*Fkrp wt*), de delección de 1 aa (*Fkrp*(-1)) y de inserción de un 1 aa (*Fkrp* (+1)) son detectables por el anticuerpo anti-FKRP (primera columna). El marcador de RE KDEL se observa en todas las células (segunda columna). La colocación de la señal no se produce ni para la construcción *wt* ni para la construcción *Fkrp*(+1). Para la mutación de delección sí se observa colocación de parte de la señal, aunque otra parte permanece sin colocarse con KDEL. Escala 20  $\mu$ m en todas las imágenes.

## ***Discusión***

Las distroglicanopatías, actualmente denominadas con las siglas MDDG, comprenden un heterogéneo grupo de enfermedades todas ellas de herencia recesiva que se caracterizan por una debilidad muscular y por afectación, en diferentes grados, del sistema nervioso y ocular. Molecularmente, la característica principal es la ausencia de glicosilación del  $\alpha$ -DG, el cual se localiza en la membrana de diferentes tipos celulares donde, a través de sus residuos glicosílicos interacciona con proteínas de la MEC anclando así a la célula en el tejido. Estos residuos glicosílicos de interacción son O-glicanos, que conforman una compleja estructura de azúcares formada por diferentes *cores* glicosílicos.

La causa genética de las distroglicanopatías comprende actualmente hasta 18 genes diferentes, codificando la mayoría de ellos glicosiltransferasas o proteínas implicadas en el proceso de glicosilación. Aún así, todavía existen bastantes casos clínicos donde la causa genética de la distroglicanopatía permanece desconocida.

En este trabajo de tesis doctoral presentamos los resultados obtenidos de un estudio global cuyo tema central son las distroglicanopatías. En este apartado se discutirán los resultados del diagnóstico de dos pacientes con sospecha de distroglicanopatía, los resultados obtenidos de la generación y caracterización del primer modelo animal KO condicional del gen *Pomt1* y, por último, los resultados obtenidos de la generación y caracterización de un modelo celular KO para los genes *Fktn* y *Fkrp*.

## **1. Estudio genético-molecular de pacientes con sospecha de distroglicanopatía**

### **1.1. Paciente 1**

En este paciente se encontraron graves anomalías cerebrales (ventriculomegalia y agenesia del cuerpo calloso) conjuntamente con problemas oculares y un aumento de la creatina quinasa sérica, todas ellas son características que podrían encuadrar a este paciente en una posible MDDGA (**Anexo I, Tabla 34**). Sin embargo, era llamativa la ausencia de lisencefalia tipo II, característica común a todas las MDDGA (**Anexo I, Tabla 34**); aunque hasta la fecha no se han descrito casos sin esta anomalía cerebral, nos planteamos la posibilidad de encontrarnos ante una variante fenotípica de la patología.

Así, los estudios de inmunohistofluorescencia (IHF) con los anticuerpos IIH6 y VIA4 han revelado ausencia de  $\alpha$ -DG glicosilado en la membrana sarcolémica (**Figura 8**), aunque también hemos encontrado algunos acúmulos en el interior de las fibras musculares cuando se utiliza el anticuerpo IIH6 (**Figura 8**). Hasta la fecha, este patrón no ha sido descrito en pacientes con alguna MDDGA.

Sin embargo, en los estudios de *western blot* (WB) realizados sí que encontramos glicosilación del  $\alpha$ -DG, manteniendo éste el mismo patrón que en el control sano para los anticuerpos IIH6 y VIA4 (**Figura 9**), aunque con este último también detectamos una banda

de menor tamaño molecular que no se observa en el control (**Figura 9B**). Los acúmulos detectados con IHH6 por IHF se podrían corresponder con  $\alpha$ -DG correctamente glicosilado. En cambio, los resultados con VIA4 podrían apuntar a un fallo en las muestras utilizadas, por lo que para descartar una posible degradación de las proteínas localizadas en la MEC del tejido realizamos una IHF contra proteínas de la MEC que interaccionan con el  $\alpha$ -DG (**Figura 10**). La correcta detección de la laminina y el perlecano en la MEC nos llevan a descartar, en parte, una degradación de la MEC en estas muestras. Por otro lado, la no detección del biglicano, podría estar apuntando a un fallo en la localización del  $\alpha$ -DG.

El biglicano es una proteína de bajo peso molecular que interacciona directamente con la secuencia proteica del  $\alpha$ -DG (Bowe *et al.*, 2000), al contrario que la laminina y el perlecano, que lo hacen con los residuos glicosílicos (Yoshida-Moriguchi and Campbell, 2015). El biglicano también interacciona con otros componentes del complejo DGC, los sarcoglicanos (Rafii *et al.*, 2006), los cuales no mostraron alteración en las inmunohistoquímicas (IHQ) realizadas en el hospital de origen (Materiales 1.1.). Esta ausencia de biglicano puede significar que el  $\alpha$ -DG no se localice en la membrana sino que permanezca glicosilado y acumulado en el interior de las fibras impidiendo la correcta localización del biglicano. Por su parte, la laminina o el perlecano podrían permanecer en la membrana unidas a otras proteínas como las integrinas (Henry *et al.*, 2001). Sin embargo, tampoco podemos descartar totalmente fallos en las muestras y creemos necesario comprobar otras proteínas de la MEC, como por ejemplo el colágeno VI.

Aún con estas discrepancias en los resultados, nos hemos preguntado por el origen genético de esta anomalía. Para ello hemos utilizado las nuevas tecnologías de secuenciación de exoma, que nos permiten conocer la secuencia de todos los exones de un individuo y compararla con el genoma humano de referencia. Metodología que ha demostrado su importancia en el diagnóstico de enfermedades mendelianas (Ng *et al.*, 2010). El resultado obtenido no fue el esperado para un diagnóstico de distroglicanopatías, ya que las mutaciones obtenidas en genes candidatos de distroglicanopatía no son patogénicas (**Tablas 29 y 30**). Al ampliar el análisis a otros genes hemos descubierto la posible causa genética de la patología de este paciente, consistente en la mutación c.1351C>T en homocigosis en el gen *EPG5*, que genera un codón de parada de la traducción prematuro p.Gln451Ter.

El gen *EPG5* (*ectopic P-granules 5*) es el homólogo humano del gen *Epg5* de *C. elegans*. Este gen, junto con otros cuatro, está implicado en la regulación de pasos específicos del proceso de autofagia (Tian *et al.*, 2010). *EPG5* interviene en el proceso denominado macroautofagia, un mecanismo altamente conservado mediante el cual la

célula degrada componentes celulares, agregados proteicos o incluso organismos patógenos. Estos componentes a degradar se incluyen en vesículas membranosas (autofagosomas) que posteriormente se fusionan con los lisosomas (vesículas cargadas con enzimas de degradación), formando así el denominado autolisosoma (Bento *et al.*, 2016). Esta ruta está relacionada también con la endocitosis, en ella el autofagosoma puede fusionarse con los endosomas tardíos, generando el anfisoma, que tras la unión del lisosoma, generaría también un autolisosoma (Klionsky *et al.*, 2014). Se ha descrito que EPG5 participa en la maduración de los autolisosomas (Zou *et al.*, 2012) y que también participa en la vía de la endocitosis (Zhao *et al.*, 2013), pero ha sido muy recientemente que se ha descrito la función específica de EPG5 como efector de la proteína Rab7 (endosomas) y de interacción con LC3 (autofagosomas), participando así en la formación del anfisoma/autolisosoma (Wang *et al.*, 2016).

El gen *EPG5* se ha descrito como causante del síndrome de Vici (Cullup *et al.*, 2012), un síndrome que actualmente se engloba dentro de los denominados desórdenes congénitos de autofagia (Ebrahimi-Fakhari *et al.*, 2016). El síndrome de Vici (OMIM 242840) es un desorden congénito multisistémico grave y de herencia recesiva, cuyos principales síntomas clínicos son: agenesia del cuerpo calloso, cardiomiopatía, hipopigmentación, cataratas y la presencia de inmunodeficiencia adquirida (Byrne *et al.*, 2016a). Muchas de estas características solapan con las de las MDDGA (**Anexo I, Tabla 34**) lo que explicaría nuestra sospecha inicial en este paciente y, de confirmar el diagnóstico de síndrome de Vici, el por qué no presentaba lisencefalia tipo II. Es destacable en este paciente la ausencia de hipopigmentación, pero en una reciente revisión de 50 pacientes con síndrome de Vici se ha demostrado que esta característica está en el 95% de los casos analizados, existiendo pacientes con pigmentación normal (Byrne *et al.*, 2016b).

Para comprobar si el paciente 1 se corresponde con un síndrome de Vici, hemos realizado estudios por WB de los niveles de expresión de p62 y LC3-II, dos proteínas que participan en la autofagia y cuya acumulación se utiliza como indicador de anomalías en la vía (Klionsky *et al.*, 2016). Ambas proteínas aparecen en WB significativamente acumuladas en el músculo esquelético del paciente 1 (**Figura 12**), de la misma forma que sucede en el modelo animal KO de *Epg5* (Zhao *et al.*, 2013). Esta acumulación no se ha podido comprobar mediante IHF (**Figura 13**).

Con estos datos podemos plantear un mecanismo patológico para este paciente (**Anexo I, Figura 35**), donde la acumulación de las proteínas LC3 y p62 podría indicar un bloqueo de la vía de autofagia en el que se acumulan los autofagosomas al impedirse la formación del anfisoma/autolisosoma. Por otra parte, se ha descrito que el  $\alpha$ -DG interacciona con Rab7 en la internalización de la laminina (Leonoudakis *et al.*, 2014), lo que

es indicativo de su participación en la endocitosis y podría explicar los acúmulos de  $\alpha$ -DG en el interior de las fibras (**Figura 8**) como endosomas tempranos o tardíos acumulados al no poder fusionarse para formar el anfisoma/autolisosoma. Con anterioridad al anfisoma puede producirse la fusión del endosoma tardío con el lisosoma (endolisosoma) (Huotari and Helenius, 2011) pudiendo ser la acción de las enzimas lisosómicas una explicación de la banda de menor peso molecular obtenida en WB en este paciente (**Figura 9**).

En resumen, los datos genéticos, moleculares y clínicos parecen apuntar a un caso de síndrome de Vici y no de distroglicanopatía. Si revisamos la bibliografía reciente que recoge mutaciones en este gen (Byrne *et al.*, 2016b), así como la base de datos OMIM, no hemos encontrado que la mutación c.1351C>T (p.Gln451Ter) esté descrita hasta el momento. Si ampliamos esta búsqueda a la base de datos de variaciones *ExAc* (<http://exac.broadinstitute.org/variant/18-43531106-G-A>), confirmamos que esta mutación no ha sido descrita nada más que en un individuo del sudeste asiático, en el que se encuentra en heterocigosis. Por lo tanto, con estos datos genéticos podemos decir que nos encontraríamos ante la primera descripción en homocigosis de esta mutación c.1351C>T (p.Gln451Ter) como causante del síndrome de Vici. Además, teniendo en cuenta el origen filipino de la familia, la falta de consanguinidad en los parentales y el hecho de que la única otra descripción de esta mutación sea en otro individuo del sudeste asiático, nos estaría indicando que podría ser una mutación fundadora en esta zona geográfica, aunque para confirmarlo necesitaríamos ampliar el número de individuos a estudio.

## **1.2. Paciente 2**

En el caso del paciente 2 también nos encontramos con importantes anomalías a nivel del SNC (microcefalia, cuerpo calloso adelgazado, ventriculomegalia), además de presencia de problemas oculares, epilepsia y signos de afectación miopática (Materiales 1.2.), las cuales se han descrito en casos anteriores de distroglicanopatías graves tipo WWS con mutación en el gen *POMT1* (Messina *et al.*, 2008). Al igual que en el caso del paciente 1, nos llamó la atención la ausencia de lisencefalia tipo II, de nuevo planteándonos la hipótesis en inicio de una variante fenotípica.

Los estudios de IHF mostraron, tanto con el anticuerpo I1H6 como con el VIA4, un patrón quimérico, existiendo fibras tanto con el  $\alpha$ -DG glicosilado como sin glicosilar (**Figura 8**). Este patrón por IHF ya ha sido observado con anterioridad en pacientes con distroglicanopatías intermedias (MDDGB) con mutaciones en los genes *POMT1* y *POMT2* (Jimenez-Mallebrera *et al.*, 2009, Messina *et al.*, 2008). Por su parte, los estudios de WB demuestran la existencia de  $\alpha$ -DG glicosilado de la misma forma que en los controles, pero

también la existencia de  $\alpha$ -DG glicosilado de menor tamaño detectable por cada uno de los anticuerpos utilizados (**Figura 9**). Es destacable este hecho, ya que hasta el momento la presencia de bandas de menor peso molecular solo se han podido detectar con anticuerpos contra la secuencia proteica del  $\alpha$ -DG (Michele *et al.*, 2002, Willer *et al.*, 2012, Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2010). Solamente se han descrito bandas similares después de tratamientos enzimáticos o químicos que eliminan residuos glicosílicos específicos (Combs and Ervasti, 2005, Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2010), por lo que es posible que las bandas observadas se deban a eliminaciones específicas de glicanos en el  $\alpha$ -DG.

En conjunto, estos datos no permitían ni descartar ni confirmar la sospecha de distroglicanopatía, por lo tanto nos centramos en buscar la causa genética en el estudio de exoma encargado por el hospital de origen. En los datos aportados no se han encontrado mutaciones en genes candidatos de distroglicanopatía, pero tampoco se han encontrado, a diferencia del paciente 1, mutaciones en genes cuya clínica encaje con la de este paciente. Por lo tanto, la causa genética de momento sigue siendo desconocida.

Por otra parte, el estudio de IHQ realizado con anterioridad en el hospital reveló la presencia de vacuolas autofágicas (vacuolas *rimmed*) en el interior de algunas fibras musculares (Materiales 1.2.). Debido a la experiencia obtenida en el estudio del paciente 1, evaluamos en este paciente el estado de los marcadores autofágicos p62 y LC3-II. El resultado obtenido mediante WB nos muestra una acumulación significativa de LC3-II, siendo observable también esta acumulación por IHF en el interior de las fibras. Esta LC3 acumulada colocaliza con el marcador lisosómico LAMP1 (**Figura 13**), por lo que la fusión del autofagosoma al lisosoma para formar el autolisosoma podría estar produciéndose.

Basándonos en el mecanismo patológico propuesto para el paciente 1 planteamos un modelo similar para este paciente 2 (**Anexo I, Figura 35**). La acumulación de LC3-II unido a la formación del autolisosoma nos indicaría que la vía de autofagia se detiene tras la fusión, por lo que la posible causa genética podría encontrarse en genes que actúen posteriormente. La formación del autolisosoma podría permitir a las enzimas lisosómicas actuar sobre el  $\alpha$ -DG, pudiendo explicar la aparición de las bandas de menor peso molecular como productos de degradación, donde no se afectarían las glicosilaciones como pensamos inicialmente.

Sin un gen candidato, solo podemos basarnos en la clínica manifestada y los resultados moleculares obtenidos, que en conjunto podrían encuadrar al paciente 2 dentro de las miopatías con vacuolas autofágicas (AVMs). Muchas de estas miopatías comparten con nuestro paciente la presencia de componentes sarcolémicos en las vacuolas, como se describió por IHQ en el hospital de origen (Sugie *et al.*, 2005). Dos de las AVM más

conocidas, la enfermedad de Pompe y la enfermedad de Danon, han sido descartadas inicialmente. La primera por la ausencia de fibras PAS positivas, característica reconocida en el diagnóstico de esta enfermedad (Hagemans *et al.*, 2010) y ausencia de mutaciones en el gen *GAA* en el exoma; y en el caso de la enfermedad de Danon debido a la ausencia de mutación en el gen *LAMP2* y de una cardiomiopatía clara. Existen otras enfermedades dentro de las AVMs (Cho and Noguchi, 2013), pero la mayoría de las anomalías cerebrales encontradas en el paciente 2 no cuadran con la sintomatología de éstas.

Por lo tanto, podríamos encontrarnos ante un nuevo tipo de AVM, aunque para confirmarlo, sería necesario revisar previamente la cobertura obtenida en el exoma para los genes ya descritos como causantes de AVM. La utilización de otras pruebas, como la microscopia electrónica de las fibras, nos permitiría conocer más en detalle el contenido de las vacuolas presentes en las mismas.

## **2. Generación de modelo *knockout* condicional de *Pomt1* en retina**

La generación de este modelo para el gen *Pomt1* continua el trabajo llevado a cabo por nuestro grupo en este gen durante varios años. Como ya se comentó en la introducción, POMT1 es la primera enzima que, junto con POMT2 (Manya *et al.*, 2004), introduce la manosa inicial de los diferentes *cores* O-manosilados del  $\alpha$ -DG (Yoshida-Moriguchi and Campbell, 2015). Pacientes con mutaciones en *POMT1* presentan importantes anomalías musculares, cerebrales y oculares (Beltrán-Valero de Bernabé *et al.*, 2002, Godfrey *et al.*, 2007), incluyendo entre estas últimas: malformaciones retinianas, hipoplasia del nervio óptico o ceguera (Cormand *et al.*, 2001, Dobyns *et al.*, 1989). Son estas anomalías, así como el papel del DG y su glicosilación en la formación de la retina (Lunardi *et al.*, 2006) y en el funcionamiento de la misma (Satz *et al.*, 2009) las que nos han llevado a plantear la generación de este modelo animal centrado en este tejido.

La utilización de modelos animales de distroglicanopatía ha permitido aumentar el conocimiento de las mismas. Así, gracias a estos modelos se ha podido estudiar la función del DG en el desarrollo (Satz *et al.*, 2008), reproducir determinadas mutaciones comunes de *Fkrp* (Ackroyd *et al.*, 2009, Blaeser *et al.*, 2013, Chan *et al.*, 2010), corroborar genes como causantes de distroglicanopatía (Manzini *et al.*, 2012), e incluso se han desarrollado modelos para aproximaciones terapéuticas (Kanagawa *et al.*, 2009). Todo esto permite comprender las ventajas en la investigación que aporta la generación de animales modelo.

En este trabajo de tesis doctoral se ha generado un modelo *knockout* condicional de *Pomt1* (*Pomt1* KOc) que permite superar la letalidad embrionaria del modelo constitutivo demostrada con anterioridad por nuestro grupo (Willer *et al.*, 2004), y que también se ha observado en modelos murinos de *Dag1* (Williamson *et al.*, 1997), *Pomt2* (Hu *et al.*, 2011) y



*Fktn* (Kurahashi *et al.*, 2005). Para la generación de nuestro modelo condicional hemos seleccionado el sistema *cre-loxP*, derivado del bacteriófago P1 (Sauer and Henderson, 1988, Sternberg and Hamilton, 1981). Este sistema permite expresar la recombinasa *cre* en diferentes tejidos y/o momentos específicos del desarrollo en función del promotor con el que se fusione la secuencia codificante de la recombinasa. Para causar la eliminación de *Pomt1* en el tejido retiniano hemos seleccionado el ratón transgénico *Crx-cre* (Nishida *et al.*, 2003), el cual expresa la recombinasa *cre* bajo el control del promotor del factor de transcripción *Crx*, específico de los fotorreceptores de la retina, y que se expresa en las primeras etapas del desarrollo de los mismos (Furukawa *et al.*, 2002).

Utilizando este ratón transgénico y animales homocigotos *Pomt1* “floxeados”, se han generado animales en cuyas retinas ambos alelos de *Pomt1* han sufrido la delección de los exones 3 y 4 (**Figura 18**). En estos modelos *Pomt1* KOc, esta delección causa la aparición de un ARN transcrito nulo (**Figura 19**) con un codón de parada prematuro que probablemente genere una proteína truncada, si bien este hecho no ha sido analizado. La falta de función de la enzima POMT1 la hemos demostrado indirectamente al comprobar la carencia de glicosilación del  $\alpha$ -DG detectada con el anticuerpo VIA4, así como la imposibilidad de este  $\alpha$ -DG no glicosilado de unirse a la laminina (**Figura 20**). Una vez se comprobó esta pérdida de glicosilación se realizó la caracterización funcional e histológica de la retina de estos animales. Esta caracterización ha sido llevada a cabo en colaboración con otros dos grupos: el grupo del Dr. José Martín Nieto (Universidad de Alicante), que ha realizado la caracterización histológica por IHF; y el grupo del Dr. Pedro de la Villa-Polo (Universidad de Alcalá de Henares), cuyo grupo se encargó de la caracterización funcional y de la caracterización por microscopia electrónica (ME). Los resultados obtenidos están recogidos en el manuscrito adjunto en el **Anexo II**, el cual se ha enviado ya para su publicación.

La caracterización funcional mediante electrorretinograma (ERG) evalúa la funcionalidad de la retina de los animales *Pomt1* KOc. Mediante impulsos lumínicos de diferente intensidad y en condiciones de oscuridad (escotópicas) o de luz (fotópicas) generamos un registro de potenciales que se divide en diferentes ondas, cada una de las cuales corresponden con la funcionalidad de los diferentes tipos celulares de la retina (Young *et al.*, 2012). Nuestro estudio muestra el análisis de las dos primeras ondas: la onda a, que analiza la funcionalidad de los fotorreceptores (conos y bastones) localizados en la retina externa; y la onda b, que refleja cómo funcionan las células de la retina interna, las células bipolares y las de la glía de Müller. En este análisis comparamos tanto la amplitud de cada una de las ondas como el tiempo implícito de la respuesta.

Las medidas de ERG en el modelo *Pomt1* KOc no han mostrado diferencias en la onda a, ni en condiciones escotópicas ni fotópicas, por lo que los fotorreceptores funcionan

correctamente. En cambio, sí que hemos encontrado diferencias significativas en la onda b, con una disminución en la amplitud y un aumento del tiempo implícito, como consecuencia de problemas en la transmisión del impulso nervioso desde los fotorreceptores a las células bipolares posteriores, la cual tiene lugar en la capa plexiforme externa (OPL, en inglés) de la retina. Estas anomalías observadas en la transmisión visual del modelo *Pomt1* KOc son similares a las descritas en otros modelos de distroglicanopatía. Así, encontramos que nuestra variación en la onda b es similar en gravedad a la observada en el modelo KOc de *Dag1* en retina (Omori *et al.*, 2012), pero más grave que en otros modelos para glicosiltransferasas del  $\alpha$ -DG, como el mutante de *Pomgnt1* (Liu *et al.*, 2006) o los modelos KO espontáneos *Large<sup>myd</sup>* y *Large<sup>vl</sup>* (Lee *et al.*, 2005). También el ratón *Pomt1* KOc presenta una afectación más grave que la observada en el modelo KO de pikachurina, proteína de la MEC que interacciona con los residuos glicosílicos del  $\alpha$ -DG (Sato *et al.*, 2008); o la del modelo de distrofina (Pillers *et al.*, 1999), proteína que interacciona con  $\beta$ -DG. Por lo tanto, estos datos muestran el papel relevante que juega el DG y su O-manosilación frente a otros componentes del DGC en la retina (pikachurina o distrofina). Además, indica el papel esencial de POMT1 en la glicosilación del  $\alpha$ -DG, donde el ser la primera enzima de la ruta resulta más importante que otras glicosiltransferasas posteriores de la misma, ya que estas otras enzimas actúan sobre un *core* O-manosilado específico mientras que POMT1 y su O-manosilación es el punto común de inicio de todos ellos.

Estos análisis funcionales se complementaron con análisis comportamentales. Así, el reflejo optomotor (Abdeljalil *et al.*, 2005), que mide la agudeza visual a la hora de discernir bandas con diferente contraste, reveló una diferencia significativa entre los controles y los animales KOc. Esta afectación también sucede en el modelo KO de pikachurina (Sato *et al.*, 2008). Otro estudio de comportamiento es el llevado a cabo en el laberinto acuático (*water maze*), donde también se encontraron diferencias significativas. Este estudio tuvo que detenerse en el periodo de entrenamiento de los animales, ya que los KOc no parecían aprender, muy probablemente debido al problema visual que presentan, aunque todavía no se ha podido descartar un problema a nivel del SNC.

Para comprobar la causa de estas deficiencias visuales se llevaron a cabo diferentes estudios histológicos. En primer lugar, indicar que no hemos encontrado variaciones destacables en la morfología de la retina de nuestros animales, a diferencia de otros modelos donde se han encontrado importantes alteraciones (Hu *et al.*, 2010, Takeda *et al.*, 2003). Este hecho es probablemente debido a la “condicionalidad”. Mientras que los modelos mencionados afectan al conjunto global del ojo, nuestros datos apoyan que nos hemos centrado solamente en la afectación de los fotorreceptores oculares.

En los análisis por IHF se describió la ausencia de detección de la subunidad  $\beta$ -DG y de la pikachurina en la OPL de la retina de los animales KOc. La falta de pikachurina se ha observado también en diferentes modelos de distroglicanopatía (Kanagawa *et al.*, 2010, Omori *et al.*, 2012). En cambio, la ausencia de  $\beta$ -DG se ha observado en los modelos KOc de *Dag1* (Omori *et al.*, 2012), KO de distrofina (Daloz *et al.*, 2001) y KO de pikachurina (Omori *et al.*, 2012), pero no en modelos KO de *Pomgnt1* o de *Large* (Kanagawa *et al.*, 2010). Esto parece reforzar la importancia de la O-manosilación frente a glicosilaciones posteriores en la localización del DG en la membrana de los fotorreceptores.

También a nivel de la OPL se ha observado una invasión (*sprouting*) de las terminaciones de las células bipolares en la capa nuclear externa (ONL) de la retina. Esto podría indicar una posible retracción de la terminal axónica de los fotorreceptores (bastones) que lleva a las células bipolares a introducirse en la ONL, para mantener las sinapsis en cinta (sinapsis *ribbon*) que se dan entre ambos tipos celulares.

El análisis por ME de estas sinapsis *ribbon* mostró una desestructuración de las mismas en el modelo *Pomt1* KOc. En una sinapsis *ribbon* normal encontramos que el pie del fotorreceptor engloba a las células bipolares y horizontales, mientras que en el caso de nuestro modelo *Pomt1* KOc, en esta sinapsis no se encuentran ni a las células bipolares ni a las células horizontales en la posición adecuada. .Esto mismo puede observarse en el modelo KO de pikachurina, lo cual refuerza la importancia de la interacción del  $\alpha$ -DG con la MEC para la formación de esta sinapsis, y apoya la hipótesis de otros autores de que el DG y su glicosilación intervienen en el proceso de la guía axonal (Wright *et al.*, 2012).

En resumen, en este trabajo de tesis doctoral se presenta el primer modelo *knockout* condicional para el gen *Pomt1*, seleccionándose la retina como tejido a afectar. La deleción causada de este gen en los fotorreceptores causan la pérdida de glicosilación del  $\alpha$ -DG, lo cual conlleva una desestructuración de la sinapsis entre los fotorreceptores y las células bipolares, generándose una alteración en la señal visual. Los resultados ponen de manifiesto la importancia de la O-manosilación frente a glicosilaciones posteriores sobre este residuo de manosa, pudiendo concluir que nuestro modelo se asemeja más al que ha sufrido la eliminación del DG que a los que han eliminado otras glicosiltransferasas.

La generación de este modelo abre la puerta para otros modelos condicionales, y al estudio mediante proteómica y glicómica de otras posibles proteínas dianas de O-manosilación. Recientemente, se han descrito como dianas de O-manosilación a la familia de las cadherinas, tanto en modelos celulares (Vester-Christensen *et al.*, 2013) como en embriones KO constitutivos de *Pomt2* (Lommel *et al.*, 2013).

### **3. Estudio de la función de mFKTN y mFKRP**

En este último apartado discutiremos los resultados obtenidos de la generación y caracterización de líneas C2C12 KO para los genes *Fktn* y *Fkrp*. Para la generación de las mismas se utilizó la tecnología de edición genómica TALEN (*transcription activator-like effector nucleases*). Esta tecnología se basa en la generación de dobles roturas en el ADN que posteriormente podrían ser reparadas por el mecanismo de unión de extremos no homólogos (NHEJ), generándose deleciones o inserciones en la cadena (Gaj *et al.*, 2013). Para generar esta doble rotura, la endonucleasa nucleasa FokI se fusiona con los dominios TALE derivados del patógeno de plantas *Xanthomonas sp.* (Bogdanove *et al.*, 2010). Estos dominios consisten en una repetición de 34 aminoácidos, dentro de los cuales los únicos aminoácidos que varían se localizan en las posiciones 12 y 13 (residuos RVD), siendo estos los que dan la especificidad a ese bloque para su unión a un determinado nucleótido (Sanjana *et al.*, 2012). Esta técnica ha permitido generar diversas mutaciones en células y animales modelo (Gaj *et al.*, 2013) y en el campo de las distroglicanopatías ha permitido la confirmación de genes causantes de ellas, como *ISPD* (Riemersma *et al.*, 2015a).

Los plásmidos TALEN-*Fktn* y TALEN-*Fkrp* se diseñaron para afectar al codón ATG iniciador de ambas proteínas, y sus tranfecciones generaron diferentes mutaciones (**Figura 23**). La aparición de más de dos bandas, que sería lo esperable en células diploides, es debido a que C2C12 es una línea inmortalizada en la que se han producido eventos de duplicación (Casas-Delucchi *et al.*, 2011). Así, para el cromosoma 4 donde se localiza *Fktn*, se han encontrado cuatro copias, mientras que para el cromosoma 7 donde mapea *Fkrp* existen tres copias. Este hecho dificultaba la generación de clones KO, ya que las TALEN debían actuar sobre un mayor número de alelos. Aún así, conseguimos generar diversos clones donde todos los cambios generados (**Tabla 33**) causaban la pérdida de glicosilación del  $\alpha$ -DG detectable por WB (**Figura 24**).

Mediante análisis por citometría de flujo, una técnica que se está empezando a aplicar en el estudio de distroglicanopatías (Stevens *et al.*, 2013b), confirmamos la reducción en la glicosilación del  $\alpha$ -DG observada por WB (**Figura 24**). De manera inesperada, también hemos observado una reducción en clones que habían presentado glicosilación por WB, aunque en algunos de ellos no era significativa. Una posible explicación para los clones con reducción significativa de la glicosilación detectada por citometría de flujo frente a WB podría ser que la mutación responsable escapara al análisis por PCR al haberse eliminado el sitio de unión de los cebadores utilizados. Por ello, sería necesario analizar estos clones con cebadores más alejados que pudiesen detectar estos cambios.

Para confirmar que la ausencia de la glicosilación del  $\alpha$ -DG se debía únicamente a la pérdida de *Fktn* o *Fkrp*, realizamos en estos mutantes el rescate fenotípico mediante la sobreexpresión de la proteína silvestre. Aunque para *Fktn* no hemos sido todavía capaces de observar este rescate en el clon seleccionado (clon 63), sí que lo hemos podido observar en el rescate para *Fkrp* en el clon TALEN-*Fkrp* 29 (KO-29). De este rescate del clon KO-29 hemos obtenido un nuevo clon (clon rC6) donde las células sobreexpresan la construcción tanto a nivel de ARN como de proteína, y donde se observa la recuperación de la glicosilación del  $\alpha$ -DG (**Figura 25**). En este estudio solo se detecta mFKRP si está sobreexpresada, ya que en el control silvestre no se detecta ninguna banda a la misma altura, dando una idea de los niveles de expresión endógenos de esta proteína.

### 3.1. Análisis comparativo del perfil glicoproteómico

Aunque no habíamos conseguido revertir el fenotipo en los clones KO *Fktn*, se decidió estudiar el perfil glicoproteómico de ambos KOs comparándolo con el perfil de la línea silvestre. Con anterioridad, nuestro grupo, en colaboración con el grupo del Dr. Larson, ya describió el perfil de los glicanos existentes en el  $\alpha$ -DG endógeno de la línea C2C12 silvestre (Gomez Toledo *et al.*, 2012). El estudio pretendía corroborar esos datos y a la vez comprobar las diferencias en glicanos generadas al eliminar los genes *Fktn* o *Fkrp*.

Comparando los resultados obtenidos anteriormente con los de este trabajo se comprueba que en la línea silvestre no hay diferencias, únicamente no se detectan ciertos residuos terminales (p. ej. fucosa). Esto podría deberse a la omisión de la inmunoprecipitación con el anticuerpo VIA4 utilizado en el trabajo anterior y que aumentaría la cantidad de DG a estudio. La inmunoprecipitación no se realizó al considerar que podría derivar en la pérdida de glicopéptidos.

En cuanto a los datos comparados, observamos que los residuos detectados no son diferentes entre la línea silvestre y los clones KO. La única diferencia es la distribución de los mismos en las dos fracciones analizadas (**Figura 26**). La aparición de una mayor cantidad de péptidos en la fracción de menor peso molecular de los clones KO nos indica que, aunque el DG mantiene su O-glicosilación, ha perdido residuos no identificados en este estudio que hacen que baje su tamaño molecular. Si analizamos en profundidad los residuos obtenidos vemos que se han detectado tanto residuos tipo mucina como los residuos que podrían corresponder al *core* M1 O-manosilado (ver Introducción y **Figura 26**).

En base a estos resultados, la hipótesis que nos planteamos es que tanto FKTN como FKRP deberían actuar en otro *core* O-manosilado, el *core* fosfomanosilado M3 (Yoshida-Moriguchi and Campbell, 2015), el cual no ha sido detectado en este ensayo. Este *core* no se encontró tampoco en el anterior estudio realizado sobre la línea silvestre (Gomez Toledo *et*

*al.*, 2012), ni tampoco se ha descrito de manera endógena en estudios glicómicos realizados en animales modelo de distroglicanopatías (Stalnaker *et al.*, 2011). Tanto su descripción (Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2010) como estudios posteriores en relación a él (Praisman *et al.*, 2016, Yoshida-Moriguchi *et al.*, 2013) siempre han necesitado una sobreexpresión de construcciones de  $\alpha$ -DG. Por ello, iniciamos el diseño de construcciones para sobreexpresar el  $\alpha$ -DG, el cual posteriormente obtendríamos del medio de cultivo y analizaríamos.

Durante la realización de estos experimentos finales, otros grupos describieron la función tanto de la FKTN como de la FKRP (Gerin *et al.*, 2016, Kanagawa *et al.*, 2016). Estas publicaciones demuestran que ambas proteínas actúan como glicosiltransferasas que transfieren ribitol 5-fosfato. En el caso de la FKTN lo hace sobre el residuo terminal del *core* M3 de GalNAc, mientras que la FKRP actúa sobre el residuo añadido previamente por la FKTN, generándose así un tándem de ribitol 5-fosfato. Ambas proteínas transfieren este residuo desde CDP-ribitol, el cual es producido por la ISPD (Riemersma *et al.*, 2015a).

En resumen, nuestra hipótesis parecía correcta al aproximarse a la idea de que estas proteínas actuarían en el *core* M3, aunque fuimos incapaces de detectarlo de manera endógena. Este hecho puede ser debido a diferencias en las técnicas utilizadas, o bien a la poca presencia de este residuo dentro de la región mucinas del  $\alpha$ -DG.

### 3.2. Regulación transcripcional por parte de mFKTN y mFKRP

En este segundo apartado hemos pretendido acercarnos al papel regulador que tienen ambas proteínas, bien directamente o bien indirectamente a través de la glicosilación del  $\alpha$ -DG. No existen referencias de un papel en regulación ni para FKTN ni para FKRP, probablemente debido a que hasta hace poco se desconocía su función, pero sí que era predecible un posible papel dentro de rutas de señalización para el DG.

Se ha descrito que el DG, a través del  $\beta$ -DG, se une al transductor de señales Grb2 (Russo *et al.*, 2000), el cual transfiere la señal que provoca la unión de la laminina a los residuos del  $\alpha$ -DG (Zhou *et al.*, 2006). También se ha implicado al DG en el control de la señalización dirigida por diferentes hormonas (Leonoudakis *et al.*, 2010), en el desarrollo de diferentes tejidos (Sirour *et al.*, 2011), e incluso en el desarrollo de organismos completos (Poulton and Deng, 2006).

Los resultados obtenidos de los estudios comparativos por RNAseq entre la línea C2C12 silvestre y los clones TALEN-*Fkrp* 29 (KO-29) y TALEN-*Fktn* 63 (KO-63) demostraron la existencia de un elevado número de genes diferencialmente expresados, siendo mayor ésta para *Fkrp*, por lo que este clon fue elegido para continuar el estudio.

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de la regulación del proceso de diferenciación muscular por FKRP, al encontrar un elevado número de genes implicados en este proceso en el estudio comparativo. Por ello, para un primer estudio seleccionamos 12 genes que están descritos como reguladores o implicados en la diferenciación (**Figura 27**). Entre ellos están genes reguladores positivos de la miogénesis como *Mef2c* (Potthoff *et al.*, 2007) o *Csrp3* (Arber *et al.*, 1994), y genes reguladores negativos como *Id3* (Chen *et al.*, 1997), *Bmp4* (Patterson *et al.*, 2010) y *Nov* (Calhabeu *et al.*, 2006). En el caso de *Ankrd2*, aunque está descrito como regulador negativo de la miogénesis y que necesita a *Id3* para su función (Mohamed *et al.*, 2013), se sabe que en células C2C12 sus niveles deben aumentar durante los primeros estadios de su diferenciación (Pallavicini *et al.*, 2001). *Ankrd2* también nos ha interesado por su influencia en la actividad de p53 (Bean *et al.*, 2008), otro regulador positivo de la miogénesis (Porrello *et al.*, 2000).

En las células C2C12 silvestres hemos observado el comportamiento esperado para estos genes al diferenciarse, pero no para clon KO-29 de *Fkrp* (**Figuras 28 y 29**). Aquí, los elevados niveles en reguladores negativos podrían estar indicando una inhibición de la diferenciación. También son relevantes los niveles de expresión de estos genes en el clon rC6, proveniente del clon KO-29 y en el que habíamos demostrado el rescate de la glicosilación (**Figura 25**). En este clon rC6 podemos observar que, en lugar de recuperar los niveles génicos de C2C12 silvestre, la mayoría de los genes se expresan a los mismos niveles del clon KO-29 (**Figuras 28**). Incluso podemos observar cómo para los reguladores negativos *Bmp4*, *Id3* y *Nov* sus niveles en el clon rC6 superan a los del clon KO-29, lo cual muestra que no solo no es efectivo el rescate a nivel transcriptómico en este clon, sino que la sobreexpresión de mFKRP podría estar causando una represión mayor del proceso de diferenciación muscular. Este hecho parece confirmarse cuando hemos estudiado el grupo de genes sarcoméricos y metabólicos, los cuales aumentan sus niveles al diferenciarse el músculo (Galvagni *et al.*, 1998, Kislinger *et al.*, 2005, Van Der Loop *et al.*, 1996, Moran *et al.*, 2002). En este análisis podemos ver que, tanto en el clon KO-29 como en el clon rC6, ninguno de los genes alcanza los niveles del control silvestre (**Figura 29**).

Estos primeros datos del clon KO-29 podrían apuntar a que la ausencia de mFKRP causa un bloqueo de la diferenciación muscular a través de la activación de *Bmp4*, *Nov* e *Id3*, los cuales han sido relacionados con la vía Notch (Dahlqvist *et al.*, 2003, Reynaud-Deonauth *et al.*, 2002, Sakamoto *et al.*, 2002), la cual se ha descrito como represora de la miogénesis en la línea C2C12 (Buas *et al.*, 2009). Para confirmar que esto sucedía ante cualquier mutación de *Fkrp*, ampliamos el estudio al clon TALEN-*Fkrp* 2 (KO-2), donde hemos observado que no se repiten la mayoría de los datos observados en el clon KO-29 (**Figura 30**). En este clon KO-2 los genes represores se encuentran a niveles similares al silvestre y,



aunque presenta diferencias significativas con él, éstas son también diferentes con respecto al clon KO-29. Por lo tanto, no podemos obtener una conclusión clara de la regulación génica que puede realizar mFKRP o su efecto sobre el  $\alpha$ -DG, haciéndose necesario ampliar el número de clones C2C12 KO de *Fkrp* a estudio.

En segundo lugar, la sobreexpresión mFKRP parece agravar el fenotipo, al menos en el clon rC6. Con anterioridad, otros autores han descrito cómo la expresión exógena de LARGE, el cual al sobreexpresarse hiperglicosila al  $\alpha$ -DG (Brockington *et al.*, 2010) y que se postulaba como posible terapia, causa un agravamiento de la distrofia muscular en un modelo KO de *Fkrp* (Whitmore *et al.*, 2014). Posteriormente, se describió que la sobreexpresión de LARGE en la línea C2C12 causaba un descenso en la expresión de IGF1 (*insulin-like growth factor 1*), una molécula promotora de la miogénesis (Saito *et al.*, 2014). Un mecanismo similar podría estar sucediendo en nuestro clon rC6. De nuevo nos encontramos ante el hecho de que sólo hemos analizado un único clon rescatado, y por lo tanto los datos no son significativos, y necesitamos analizar más clones rescatados para ésta y otras mutaciones.

En resumen, nuestra primera aproximación a la regulación llevada a cabo por mFKRP o por la glicosilación del  $\alpha$ -DG no ha aportado datos significativos ya que el estudio de dos clones muestra datos diferentes. Pero sí que nos permite discutir que la sobreexpresión exógena de este gen para rescatar el fenotipo puede conllevar variaciones no controladas de la expresión de otros genes.

### **3.3. Secuencia de localización de mFKRP**

En este último estudio nos hemos centrado en analizar cómo la variación de un único aminoácido podría afectar a la localización de mFKRP dentro de la célula, y por ello a su función en la glicosilación del  $\alpha$ -DG.

FKRP se describió inicialmente como una proteína residente del AG (Esapa *et al.*, 2002), aunque otros autores postularon que su localización varía en el músculo esquelético y en la línea C2C12 en función de su estado de diferenciación, encontrándose en estos casos en compartimentos perinucleares o del retículo endoplasmático (RE) (Matsumoto *et al.*, 2004).

El anclaje de FKRP al AG se produce gracias a la presencia de dos aminoácidos básicos (argininas en FKRP) en el dominio tallo que se localiza inmediatamente anterior al dominio transmembrana (TM) (Esapa *et al.*, 2002). Estos aminoácidos están presentes también en otras muchas glicosiltransferasas (Esapa *et al.*, 2002). Además, en la proteína relacionada FKTN, se ha demostrado que estos aminoácidos y otros posteriores a la región



TM también son necesarios para el correcto posicionamiento de este dominio en la bicapa lipídica (Holdbrook *et al.*, 2010). Además, esta región también es importante para la dimerización de FKRP, ya que en este punto se localizan residuos de cisteína que permiten la formación de puentes disulfuro (Alhamidi *et al.*, 2011). Por otra parte, contrariamente a la localización en el AG, otros autores definen a esta región como péptido señal e identifican a FKRP como proteína de secreción cuando pierde esta región. Por lo tanto, mutaciones en esta región podrían estar variando el patrón de expresión de FKRP (Lu *et al.*, 2010) y de ahí nuestro interés.

Las mutaciones que nosotros hemos estudiado no afectan directamente a estos residuos básicos, sino que causan el acortamiento o alargamiento de la región entre ellos al introducir/eliminar un aminoácido. La delección afecta a la glicosilación del  $\alpha$ -DG (clon 2, **Figura 24**) pero no parece afectar si se añade un aminoácido a esta región (clon 66, **Figura 24**). Con anterioridad ya se ha demostrado que otras mutaciones en FKRP provocan la deslocalización de la proteína del AG, pero ninguna de ellas se localizaba en esta región tallo (Esapa *et al.*, 2005). Por lo tanto nos planteamos estudiar si la delección/adición de 1 aa lleva a la deslocalización de mFKRP, causando con ello la pérdida de glicosilación del  $\alpha$ -DG.

Tras comprobar que ninguna de las mutaciones alteraba la generación de la proteína (**Figura 31**) realizamos los experimentos de localización en células C2C12 silvestres. Nuestros primeros estudios no han conseguido un elevado número de células que nos permitan una conclusión clara, pero sí unos datos preliminares en los cuales observamos que la adición de un aminoácido en esta región no afecta a la localización de la proteína en el AG, asemejándose a la localización de la mFKRP silvestre (**Figura 32**). En cambio, la eliminación de un aminoácido de esta región sí que afecta a su localización en el AG, haciendo que la proteína se localice parcialmente en el RE (**Figura 33**).

En resumen, estos primeros resultados parecen indicar que no solo los residuos básicos de esta región tallo son necesarios para la localización de FKRP en el AG, sino que también la distancia entre ellos es importante. Una posible hipótesis es que el acortamiento de esta región causa una inestabilidad en la interacción con la bicapa lipídica que no es causada por el alargamiento de la misma. Estos primeros datos necesitan ser confirmados con un mayor número de células y experimentos adicionales, así como estudiar su localización en cultivos diferenciados.

## *Conclusiones*

1. Los pacientes analizados en este trabajo presentan tanto una alteración en el patrón de glicosilación del  $\alpha$ -DG como problemas en la ruta de la degradación por autofagia, pudiendo estar ambos correlacionados.
2. El paciente 1 presenta en homocigosis la mutación c.1351C>T (p.Gln451Ter) en el gen *EPG5*. Este gen es el causante del síndrome de Vici, cuyos síntomas clínicos concuerdan con los de este paciente. La ausencia de la proteína EPG5 podría explicar tanto la presencia de acúmulos de  $\alpha$ -DG glicosilado como el aumento en los niveles de las proteínas p62 y LC3-II. Las bandas detectadas de menor peso molecular del  $\alpha$ -DG glicosilado podrían explicarse por la acción de enzimas lisosómicas que actúan sobre él en el endosoma/lisosoma.
3. La mutación c.1351C>T solo se ha descrito en heterocigosis en un individuo del sudeste asiático, siendo este paciente 1 el primero que se describe con ella en homocigosis. Considerando el origen geográfico de la familia y su no consanguinidad planteamos que esta mutación sea fundadora en la población del sudeste asiático.
4. En el paciente 2 los resultados de los análisis histológicos y moleculares podrían corresponderse con una miopatía con vacuolas autofágicas. Los resultados obtenidos del estudio en la vía de la autofagia podrían explicarse por mutaciones en genes que participan en procesos posteriores a la formación del autolisosoma. De nuevo, las bandas detectadas de menor peso molecular del  $\alpha$ -DG glicosilado podrían deberse a la acción de enzimas lisosómicas.
5. En este trabajo hemos generado un modelo murino *knockout* condicional para el gen *Pomt1* en los fotorreceptores de la retina, mediante la eliminación a nivel genómico y de ARN de sus exones 3 y 4. La falta de función de POMT1 se ha confirmado al no detectarse la glicosilación del  $\alpha$ -DG en la retina, y al ser éste incapaz de unirse a la laminina. La pérdida de la glicosilación solo se produce en los ratones *knockout* homocigotos, confirmando el carácter recesivo de la enfermedad.
6. Mediante la colaboración con otros grupos de investigación, hemos descrito que la ausencia de  $\alpha$ -DG glicosilado en la retina del modelo *knockout* condicional para *Pomt1* causa una desestructuración de la sinapsis tipo *ribbon* entre los fotorreceptores y las células bipolares, lo cual lleva asociado una alteración en la transmisión del impulso visual. Esta ausencia de glicosilación también causa la pérdida de la localización en la

capa plexiforme externa de proteínas que interaccionan con el  $\alpha$ -DG, como son el  $\beta$ -DG y la pikachurina.

7. Mediante la tecnología de edición genómica TALEN hemos generado líneas celulares de mioblasto de ratón C2C12 *knockout* para los genes *Fktn* y *Fkrp*. En ellas se confirma la pérdida de la glicosilación del  $\alpha$ -DG, por *western blot* y citometría de flujo. El rescate de la glicosilación del  $\alpha$ -DG mediante la sobreexpresión de las proteínas silvestres solo ha sido posible para el clon TALEN-*Fkrp* 29.
8. Los análisis glicoproteómicos comparativos realizados entre la línea celular C2C12 silvestre y los clones TALEN-*Fktn* 63 o TALEN-*Fkrp* 29 no han permitido observar residuos glicosílicos diferentes en el  $\alpha$ -DG, siendo la única diferencia detectable la distribución entre las dos fracciones de distinto peso molecular analizadas. Los resultados obtenidos podrían indicar que ambas proteínas participan en la generación del *core* fosfomanosilado 3 no detectado en este estudio. Esta hipótesis ha sido confirmada por otros autores durante la realización de este trabajo.
9. Los análisis del perfil transcriptómico realizados entre la línea celular C2C12 silvestre y los clones TALEN-*Fktn* 63 o TALEN-*Fkrp* 29 han revelado un elevado número de genes diferencialmente expresados, indicando un posible papel en la regulación génica de ambas proteínas. El análisis realizado en el clon TALEN-*Fkrp* 29 y su clon rescatado rC6 ha confirmado la expresión diferencial de genes de diferenciación muscular. La expresión de estos genes no recupera los niveles del silvestre al sobreexpresar la proteína mFKRP, lo que podría ser indicativo de la necesidad de una homeostasis en los niveles de esta proteína. El estudio de expresión de estos genes en otro clon con ausencia de glicosilación de  $\alpha$ -DG (clon TALEN-*Fkrp* 2) ha dado resultados contradictorios, por lo que sería necesario ampliar el número de clones a estudio para confirmar la significancia de los datos de expresión obtenidos.
10. Los estudios de la señal de retención en el aparato de Golgi de mFKTN y mFKRP indican que la adición o eliminación de un aminoácido entre los residuos básicos esenciales para su localización no afectan a la expresión de estas proteínas. Los análisis preliminares de las construcciones de *Fkrp* en células C2C12 silvestres indicarían que solo la delección de un aminoácido, pero no su inserción, afecta a la localización de *Fkrp*, causando su acumulación parcial en el retículo endoplasmático.

## *Bibliografía*

- Abdeljalil, J.; Hamid, M.; Abdel-mouttalib, O.; Stéphane, R.; Raymond, R.; Johan, A.; José, S.; *et al.* (2005) The optomotor response: a robust first-line visual screening method for mice. *Vision Res.*, **45** (11), 1439–1446.
- Ackroyd, M. R.; Skordis, L.; Kaluarachchi, M.; Godwin, J.; Prior, S.; Fidanboyly, M.; Piercy, R. J.; *et al.* (2009) Reduced expression of fukutin related protein in mice results in a model for fukutin related protein associated muscular dystrophies. *Brain*, **132** (2), 439–451.
- Akasaka-Manyá, K.; Manyá, H.; Hayashi, M.; Endo, T. (2011) Different roles of the two components of human protein O-mannosyltransferase, POMT1 and POMT2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **411** (4), 721–725.
- Akasaka-Manyá, K.; Manyá, H.; Nakajima, A.; Kawakita, M.; Endo, T. (2006) Physical and functional association of human protein O-mannosyltransferases 1 and 2. *J. Biol. Chem.*, **281** (28), 19339–19345.
- Alhamidi, M.; Kjeldsen Buvang, E.; Fagerheim, T.; Brox, V.; Lindal, S.; Ghelue, M. van; Nilssen, Ø. (2011) Fukutin-related protein resides in the Golgi cisternae of skeletal muscle fibres and forms disulfide-linked homodimers via an N-terminal interaction. *PLoS One*, **6** (8), e22968.
- Allikian, M. J.; McNally, E. M. (2007) Processing and assembly of the dystrophin glycoprotein complex. *Traffic*, **8** (3), 177–183.
- Aravind, L.; Koonin, E. V. (1999) The fukutin protein family-predicted enzymes modifying cell-surface molecules. *Curr. Biol.*, **9** (22), R836–R837.
- Arber, S.; Halder, G.; Caroni, P. (1994) Muscle LIM protein, a novel essential regulator of myogenesis, promotes myogenic differentiation. *Cell*, **79** (2), 221–231.
- Avşar-Ban, E.; Ishikawa, H.; Manyá, H.; Watanabe, M.; Akiyama, S.; Miyake, H.; Endo, T.; *et al.* (2010) Protein O-mannosylation is necessary for normal embryonic development in zebrafish. *Glycobiology*, **20** (9), 1089–1102.
- Balci, B.; Uyanik, G.; Dincer, P.; Gross, C.; Willer, T.; Talim, B.; Haliloglu, G.; *et al.* (2005) An autosomal recessive limb girdle muscular dystrophy (LGMD2) with mild mental retardation is allelic to Walker-Warburg syndrome (WWS) caused by a mutation in the *POMT1* gene. *Neuromuscul. Disord.*, **15** (4), 271–275.
- Baranello, G.; Saredi, S.; Sansanelli, S.; Savadori, P.; Canioni, E.; Chiapparini, L.; Balestri, P.; *et al.* (2015) A novel homozygous *ISPD* gene mutation causing phenotype variability in a consanguineous family. *Neuromuscul. Disord.*, **25** (1), 55–59.
- Barresi, R.; Campbell, K. P. (2006) Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J. Cell Sci.*, **119** (Pt 2), 199–207.

- Bean, C.; Facchinello, N.; Faulkner, G.; Lanfranchi, G. (2008) The effects of Ankrd2 alteration indicate its involvement in cell cycle regulation during muscle differentiation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1783** (6), 1023–1035.
- Beedle, A. M.; Nienaber, P. M.; Campbell, K. P. (2007) Fukutin-related protein associates with the sarcolemmal dystrophin-glycoprotein complex. *J. Biol. Chem.*, **282** (23), 16713–16717.
- Beedle, A. M.; Turner, A. J.; Saito, Y.; Lueck, J. D.; Foltz, S. J.; Fortunato, M. J.; Nienaber, P. M.; *et al.* (2012) Mouse *fukutin* deletion impairs dystroglycan processing and recapitulates muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.*, **122** (9), 3330–3342.
- Bello, L.; Melacini, P.; Pezzani, R.; D’Amico, A.; Piva, L.; Leonardi, E.; Torella, A.; *et al.* (2012) Cardiomyopathy in patients with *POMT1*-related congenital and limb-girdle muscular dystrophy. *Eur. J. Hum. Genet.*, **20** (May), 1234–1239.
- Beltran-Valero de Bernabe, D.; Voit T.; Longman C.; Steinbrecher A.; Straub V.; Yuva Y.; Herrmann R.; *et al.* (2004) Mutations in the *FKRP* gene can cause muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome. *J. Med. Genet.*, **41** (5), e61–e61.
- Beltrán-Valero de Bernabé, D.; Currier, S.; Steinbrecher, A.; Celli, J.; Beusekom, E. van; Zwaag, B. van der; Kayserili, H.; *et al.* (2002) Mutations in the O-mannosyltransferase gene *POMT1* give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, **71** (5), 1033–1043.
- Bento, C. F.; Renna, M.; Ghislat, G.; Puri, C.; Ashkenazi, A.; Vicinanza, M.; Menzies, F. M.; *et al.* (2016) Mammalian autophagy: how does it work? *Annu. Rev. Biochem.*, **85** (1), 685–713.
- Biancheri, R.; Falace, A.; Tessa, A.; Pedemonte, M.; Scapolan, S.; Cassandrini, D.; Aiello, C.; *et al.* (2007) *POMT2* gene mutation in limb-girdle muscular dystrophy with inflammatory changes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **363** (4), 1033–1037.
- Blaeser, A.; Keramaris, E.; Chan, Y. M.; Sparks, S.; Cowley, D.; Xiao, X.; Lu, Q. L. (2013) Mouse models of fukutin-related protein mutations show a wide range of disease phenotypes. *Hum. Genet.*, **132** (8), 923–934.
- Bogdanove, A. J.; Schornack, S.; Lahaye, T. (2010) TAL effectors: finding plant genes for disease and defense. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **13** (4), 394–401.
- Bowe, M. A.; Mendis, D. B.; Fallon, J. R. (2000) The small leucine-rich repeat proteoglycan biglycan binds to  $\alpha$ -dystroglycan and is upregulated in dystrophic muscle. *J. Cell Biol.*, **148** (4), 801–810.
- Bozic, D.; Engel, J.; Brancaccio, A. (1998) Sequence analysis suggests the presence of an IG-like domain in the N-terminal region of  $\alpha$ -dystroglycan which was crystallized after mutation of a protease susceptible site (Arg<sup>168</sup>→His). *Matrix Biol.*, **17** (7), 495–500.

- Bozzi, M.; Morlacchi, S.; Bigotti, M. G.; Sciandra, F.; Brancaccio, A. (2009) Functional diversity of dystroglycan. *Matrix Biol.*, **28** (4), 179–187.
- Brancaccio, A.; Schulthess, T.; Gesemann, M.; Engel, J. (1995) Electron microscopic evidence for a mucin-like region in chick muscle  $\alpha$ -dystroglycan. *FEBS Lett.*, **368** (1), 139–142.
- Brockhausen, I. (1999) Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, **1473** (1), 67–95.
- Brockington, M.; Blake, D. J.; Prandini, P.; Brown, S. C.; Torelli, S.; Benson, M. A.; Ponting, C. P.; *et al.* (2001a) Mutations in the fukutin-related protein gene (*FKRP*) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin  $\alpha$ 2 deficiency and abnormal glycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan. *Am. J. Hum. Genet.*, **69**, 1198–1209.
- Brockington, M.; Torelli, S.; Sharp, P. S.; Liu, K.; Cirak, S.; Brown, S. C.; Wells, D. J.; *et al.* (2010) Transgenic overexpression of LARGE induces  $\alpha$ -dystroglycan hyperglycosylation in skeletal and cardiac muscle. *PLoS One*, **5** (12), e14434.
- Brockington, M.; Yuva, Y.; Prandini, P.; Brown, S. C.; Torelli, S.; Benson, M. A.; Herrmann, R.; *et al.* (2001b) Mutations in the fukutin-related protein gene (*FKRP*) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum. Mol. Genet.*, **10** (25), 2851–2859.
- Buas, M. F.; Kabak, S.; Kadesch, T. O. M. (2009) Inhibition of myogenesis by Notch: evidence for multiple pathways. *J. Cell. Physiol.*, **218** (1), 84–93.
- Buyse, K.; Riemersma, M.; Powell, G.; Reeuwijk, J. van; Chitayat, D.; Roscioli, T.; Kamsteeg, E.-J.; *et al.* (2013) Missense mutations in  $\beta$ -1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 1 (*B3GNT1*) cause Walker-Warburg syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, **22** (9), 1746–1754.
- Byrne, S.; Dionisi-Vici, C.; Smith, L.; Gautel, M.; Jungbluth, H. (2016a) Vici syndrome: a review. *Orphanet J. Rare Dis.*, **11** (1), 21.
- Byrne, S.; Jansen, L.; U-King-im, J. M.; Siddiqui, A.; Lidov, H. G. W.; Bodi, I.; Smith, L.; *et al.* (2016b) *EPG5*-related Vici syndrome: a paradigm of neurodevelopmental disorders with defective autophagy. *Brain*, **139** (3), 765–781.
- Calhabeu, F.; Lafont, J.; Dreau, G. Le; Laurent, M.; Kazazian, C.; Schaeffer, L.; Martinerie, C.; *et al.* (2006) NOV/CCN3 impairs muscle cell commitment and differentiation. *Exp. Cell Res.*, **312** (10), 1876–1889.
- Campanelli, J. T.; Roberds, S. L.; Campbell, K. P.; Scheller, R. H. (1994) A role for dystrophin-associated glycoproteins and utrophin in agrin-induced AChR clustering. *Cell*, **77** (5), 663–674.
- Cao, W.; Henry, M. D.; Borrow, P.; Yamada, H.; Elder, J. H.; Ravkov, E. V.; Nichol, S. T.; *et al.* (1998) Identification of  $\alpha$ -dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis



- virus and Lassa fever virus. *Science*, **282** (5396), 2079–2081.
- Carmignac, V.; Durbeej, M. (2012) Cell-matrix interactions in muscle disease. *J. Pathol.*, **226** (2), 200–218.
- Carss, K. J.; Stevens, E.; Foley, A. R.; Cirak, S.; Riemersma, M.; Torelli, S.; Hoischen, A.; *et al.* (2013) Mutations in GDP-mannose pyrophosphorylase B cause congenital and limb-girdle muscular dystrophies associated with hypoglycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan. *Am. J. Hum. Genet.*, **93** (1), 29–41.
- Casas-Delucchi, C. S.; Brero, A.; Rahn, H.-P.; Solovei, I.; Wutz, A.; Cremer, T.; Leonhardt, H.; *et al.* (2011) Histone acetylation controls the inactive X chromosome replication dynamics. *Nat. Commun.*, **2** (1), 222.
- Chai, W.; Yuen, C. T.; Kogelberg, H.; Carruthers, R. A.; Margolis, R. U.; Feizi, T.; Lawson, A. M. (1999) High prevalence of 2-mono- and 2,6-di-substituted manol-terminating sequences among O-glycans released from brain glycopeptides by reductive alkaline hydrolysis. *Eur. J. Biochem.*, **263** (3), 879–888.
- Chan, Y. M.; Keramaris-Vrantsis, E.; Lidov, H. G.; Norton, J. H.; Zinchenko, N.; Gruber, H. E.; Thresher, R.; *et al.* (2010) Fukutin-related protein is essential for mouse muscle, brain and eye development and mutation recapitulates the wide clinical spectrums of dystroglycanopathies. *Hum. Mol. Genet.*, **19** (20), 3995–4006.
- Chen, B.; Han, B. H.; Sun, X.-H.; Lim, R. W. (1997) Inhibition of muscle-specific gene expression by Id3: requirement of the C-terminal region of the protein for stable expression and function. *Nucleic Acids Res.*, **25** (2), 423–430.
- Chiba, A.; Matsumura, K.; Yamada, H.; Inazu, T.; Shimizu, T.; Kusunoki, S.; Kanazawa, I.; *et al.* (1997) Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve  $\alpha$ -dystroglycan. *J. Biol. Chem.*, **272** (4), 2156–2162.
- Chiyonobu, T.; Sasaki, J.; Nagai, Y.; Takeda, S.; Funakoshi, H.; Nakamura, T.; Sugimoto, T.; *et al.* (2005) Effects of fukutin deficiency in the developing mouse brain. *Neuromuscul. Disord.*, **15** (6), 416–426.
- Cho, A.; Noguchi, S. (2013) Autophagy in GNE Myopathy. In: *Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?* (Y. Bailly, ed.); InTech.
- Clarke, N. F.; Maugenre, S.; Vandebrouck, A.; Urtizberea, J. A.; Willer, T.; Peat, R. A.; Gray, F.; *et al.* (2011) Congenital muscular dystrophy type 1D (MDC1D) due to a large intragenic insertion/deletion, involving intron 10 of the *LARGE* gene. *Eur. J. Hum. Genet.*, **19** (4), 452–457.
- Clement, E. M.; Godfrey, C.; Tan, J.; Brockington, M.; Torelli, S.; Feng, L.; Brown, S. C.; *et al.* (2008a) Mild POMGnT1 mutations underlie a novel limb-girdle muscular dystrophy variant. *Arch. Neurol.*, **65** (1), 137–141.

- Clement, E.; Mercuri, E.; Godfrey, C.; Smith, J.; Robb, S.; Kinali, M.; Straub, V.; *et al.* (2008b) Brain involvement in muscular dystrophies with defective dystroglycan glycosylation. *Ann. Neurol.*, **64** (5), 573–582.
- Combs, A. C.; Ervasti, J. M. (2005) Enhanced laminin binding by  $\alpha$ -dystroglycan after enzymatic deglycosylation. *Biochem. J.*, **390** (Pt 1), 303–309.
- Cormand, B.; Pihko, H.; Bayés, M.; Valanne, L.; Santavuori, P.; Talim, B.; Gershoni-Baruch, R.; *et al.* (2001) Clinical and genetic distinction between Walker–Warburg syndrome and muscle–eye–brain disease. *Neurology*, **56** (8), 1059–1069.
- Cotarelo, R. P.; Valero, M. C.; Prados, B.; Peña, A.; Rodríguez, L.; Fano, O.; Marco, J. J.; *et al.* (2008) Two new patients bearing mutations in the *fukutin* gene confirm the relevance of this gene in Walker–Warburg syndrome. *Clin. Genet.*, **73** (2), 139–145.
- Cullup, T.; Kho, A. L.; Dionisi-Vici, C.; Brandmeier, B.; Smith, F.; Urry, Z.; Simpson, M. A.; *et al.* (2012) Recessive mutations in *EPG5* cause Vici syndrome, a multisystem disorder with defective autophagy. *Nat. Genet.*, **45** (1), 83–87.
- D’Amico, A.; Tessa, A.; Bruno, C.; Petrini, S.; Biancheri, R.; Pane, M.; Pedemonte, M.; *et al.* (2006) Expanding the clinical spectrum of POMT1 phenotype. *Neurology*, **66** (10), 1564–1567.
- Dahlqvist, C.; Blokzijl, A.; Chapman, G.; Falk, A.; Dannaeus, K.; Ibáñez, C. F.; Lendahl, U. (2003) Functional Notch signaling is required for BMP4-induced inhibition of myogenic differentiation. *Development*, **130** (24), 6089–6099.
- Dalloz, C.; Claudepierre, T.; Rodius, F.; Mornet, D.; Sahel, J.; Rendon, A. (2001) Differential distribution of the members of the dystrophin glycoprotein complex in mouse retina: effect of the mdx<sup>3Cv</sup> mutation. *Mol. Cell. Neurosci.*, **17** (5), 908–920.
- Dell, A.; Galadari, A.; Sastre, F.; Hitchen, P. (2010) Similarities and differences in the glycosylation mechanisms in prokaryotes and eukaryotes. *Int. J. Microbiol.*, **2010**, 148178.
- Deyst, K. A.; Bowe, M. A.; Leszyk, J. D.; Fallon, J. R. (1995) The  $\alpha$ -dystroglycan- $\beta$ -dystroglycan complex. Membrane organization and relationship to an agrin receptor. *J. Biol. Chem.*, **270** (43), 25956–25959.
- Di Costanzo, S.; Balasubramanian, A.; Pond, H. L.; Rozkalne, A.; Pantaleoni, C.; Saredi, S.; Gupta, V. A.; *et al.* (2014) *POMK* mutations disrupt muscle development leading to a spectrum of neuromuscular presentations. *Hum. Mol. Genet.*, **23** (21), 5781–5792.
- Dinçer, P.; Balcı, B.; Yuva, Y.; Talim, B.; Brockington, M.; Dinçel, D.; Torelli, S.; *et al.* (2003) A novel form of recessive limb girdle muscular dystrophy with mental retardation and abnormal expression of  $\alpha$ -dystroglycan. *Neuromuscul. Disord.*, **13** (10), 771–778.
- Dobyns, W. B.; Pagon, R. A.; Armstrong, D.; Curry, C. J.; Greenberg, F.; Grix, A.; Holmes, L. B.;

- et al.* (1989) Diagnostic criteria for Walker-Warburg syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, **32** (2), 195–210.
- Dolatshad, N. F.; Brockington, M.; Torelli, S.; Skordis, L.; Wever, U.; Wells, D. J.; Muntoni, F.; *et al.* (2005) Mutated fukutin-related protein (FKRP) localises as wild type in differentiated muscle cells. *Exp. Cell Res.*, **309** (2), 370–378.
- Dwyer, C. A.; Baker, E.; Hu, H.; Matthews, R. T. (2012) RPTP $\zeta$ /phosphacan is abnormally glycosylated in a model of muscle-eye-brain disease lacking functional POMGnT1. *Neuroscience*, **220**, 47–61.
- Ebrahimi-Fakhari, D.; Saffari, A.; Wahlster, L.; Lu, J.; Byrne, S.; Hoffmann, G. F.; Jungbluth, H.; *et al.* (2016) Congenital disorders of autophagy: an emerging novel class of inborn errors of neuro-metabolism. *Brain*, **139** (Pt 2), 317–337.
- Ervasti, J. M.; Campbell, K. P. (1991) Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*, **66** (6), 1121–1131.
- Ervasti, J. M.; Campbell, K. P. (1993) A Role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J. Cell Biol.*, **122** (4), 809–823.
- Esapa, C. T.; Benson, M. A.; Schröder, J. E.; Martin-Rendon, E.; Brockington, M.; Brown, S. C.; Muntoni, F.; *et al.* (2002) Functional requirements for fukutin-related protein in the Golgi apparatus. *Hum. Mol. Genet.*, **11** (26), 3319–3331.
- Esapa, C. T.; McIlhinney, R. A. J.; Blake, D. J. (2005) Fukutin-related protein mutations that cause congenital muscular dystrophy result in ER-retention of the mutant protein in cultured cells. *Hum. Mol. Genet.*, **14** (2), 295–305.
- Finne, J.; Krusius, T.; Margolis, R. K.; Margolis, R. U. (1979) Novel mannitol-containing oligosaccharides obtained by mild alkaline borohydride treatment of a chondroitin sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.*, **254** (20), 10295–10300.
- Furukawa, A.; Koike, C.; Lippincott, P.; Cepko, C. L.; Furukawa, T. (2002) The mouse *Crx* 5'-upstream transgene sequence directs cell-specific and developmentally regulated expression in retinal photoreceptor cells. *J. Neurosci.*, **22** (5), 1640–1647.
- Gaj, T.; Gersbach, C. a.; Barbas, C. F. (2013) ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.*, **31**, 397–405.
- Galvagni, F.; Cartocci, E.; Oliviero, S. (1998) The dystrophin promoter is negatively regulated by YY1 in undifferentiated muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **273** (50), 33708–33713.
- Gerin, I.; Ury, B.; Breloy, I.; Bouchet-Seraphin, C.; Bolsée, J.; Halbout, M.; Graff, J.; *et al.* (2016) ISPD produces CDP-ribitol used by FKTN and FKRP to transfer ribitol phosphate onto  $\alpha$ -dystroglycan. *Nat. Commun.*, **7**, 11534.
- Girrbach, V.; Zeller, T.; Priesmeier, M.; Strahl-Bolsinger, S. (2000) Structure-function

- analysis of the dolichyl phosphate-mannose: Protein O-mannosyltransferase ScPmt1p. *J. Biol. Chem.*, **275** (25), 19288–19296.
- Goddeeris, M. M.; Wu, B.; Venzke, D.; Yoshida-Moriguchi, T.; Saito, F.; Matsumura, K.; Moore, S. a; *et al.* (2013) LARGE glycans on dystroglycan function as a tunable matrix scaffold to prevent dystrophy. *Nature*, **503** (7474), 136–40.
- Godfrey, C.; Clement, E.; Mein, R.; Brockington, M.; Smith, J.; Talim, B.; Straub, V.; *et al.* (2007) Refining genotype phenotype correlations in muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan. *Brain*, **130** (Pt 10), 2725–2735.
- Godfrey, C.; Escolar, D.; Brockington, M.; Clement, E. M.; Mein, R.; Jimenez-Mallebrera, C.; Torelli, S.; *et al.* (2006) *Fukutin* gene mutations in steroid-responsive limb girdle muscular dystrophy. *Ann. Neurol.*, **60** (5), 603–610.
- Gomez Toledo, A.; Raducu, M.; Cruces, J.; Nilsson, J.; Halim, A.; Larson, G.; Rüetschi, U.; *et al.* (2012) O-mannose and O-N-acetyl galactosamine glycosylation of mammalian  $\alpha$ -dystroglycan is conserved in a region-specific manner. *Glycobiology*, **22** (11), 1413–1423.
- Hagemans, M. L. C.; Stigter, R. L.; Capelle, C. I. Van; Beek, N. A. M. E. Van Der; Winkel, L. P. F.; Vliet, L. Van; Hop, W. C. J.; *et al.* (2010) PAS-positive lymphocyte vacuoles can be used as diagnostic screening test for Pompe disease. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **33** (2), 133–139.
- Hanisch, F. G.; Breloy, I. (2009) Protein-specific glycosylation: Signal patches and cis-controlling peptidic elements. *Biol. Chem.*, **390** (7), 619–626.
- Hara, Y.; Balci-Hayta, B.; Yoshida-Moriguchi, T.; Kanagawa, M.; Beltrán-Valero de Bernabé, D.; Gündesli, H.; Willer, T.; *et al.* (2011) A dystroglycan mutation associated with limb-girdle muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.*, **364** (10), 939–946.
- Harrison, D.; Hussain, S. A.; Combs, A. C.; Ervasti, J. M.; Yurchenco, P. D.; Hohenester, E. (2007) Crystal structure and cell surface anchorage sites of laminin  $\alpha$ 1LG4-5. *J. Biol. Chem.*, **282** (15), 11573–11581.
- Harrison, R.; Hitchen, P. G.; Panico, M.; Morris, H. R.; Mekhaie, D.; Pleass, R. J.; Dell, A.; *et al.* (2012) Glycoproteomic characterization of recombinant mouse  $\alpha$ -dystroglycan. *Glycobiology*, **22** (5), 662–675.
- Hayashi, Y. K.; Ogawa, M.; Tagawa, K.; Noguchi, S.; Ishihara, T.; Nonaka, I.; Arahata, K. (2001) Selective deficiency of  $\alpha$ -dystroglycan in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Neurology*, **57** (1), 115–121.
- Henry, M. D.; Satz, J. S.; Brakebusch, C.; Costell, M.; Gustafsson, E.; Fässler, R.; Campbell, K. P. (2001) Distinct roles for dystroglycan,  $\beta$ 1 integrin and perlecan in cell surface laminin organization. *J. Cell Sci.*, **114**, 1137–1144.

- Holdbrook, D. a.; Leung, Y. M.; Piggot, T. J.; Marius, P.; Williamson, P. T. F.; Khalid, S. (2010) Stability and membrane orientation of the fukutin transmembrane domain: A combined multiscale molecular dynamics and circular dichroism study. *Biochemistry*, **49**, 10796–10802.
- Hu, H.; Candiello, J.; Zhang, P.; Ball, S. L.; Cameron, D. A.; Halfter, W. (2010) Retinal ectopias and mechanically weakened basement membrane in a mouse model of muscle-eye-brain (MEB) disease congenital muscular dystrophy. *Mol. Vis.*, **16** (July), 1415–1428.
- Hu, H.; Li, J.; Gagen, C. S.; Gray, N. W.; Zhang, Z.; Qi, Y.; Zhang, P. (2011) Conditional knockout of protein O-mannosyltransferase 2 reveals tissue-specific roles of O-mannosyl glycosylation in brain development. *J. Comp. Neurol.*, **519**, 1320–1337.
- Huotari, J.; Helenius, A. (2011) Endosome maturation. *EMBO J.*, **30** (17), 3481–3500.
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O.; Ervasti, J. M.; Leveille, C. J.; Slaughter, C. A.; Sernett, S. W.; Campbell, K. P. (1992) Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, **355** (6362), 696–702.
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O.; Milatovich, A.; Ozcelik, T.; Yang, B.; Koepnick, K.; Francke, U.; Campbell, K. P. (1993) Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum. Mol. Genet.*, **2** (10), 1651–1657.
- Ilsley, J. L.; Sudol, M.; Winder, S. J. (2001) The interaction of dystrophin with  $\beta$ -dystroglycan is regulated by tyrosine phosphorylation. *Cell. Signal.*, **13** (9), 625–632.
- Inamori, K.; Yoshida-moriguchi, T.; Hara, Y.; Anderson, M. E.; Yu, L.; Campbell, K. P. (2012) Dystroglycan function requires xylosyl- and glucuronyltransferase activities of LARGE. *Science*, **335** (6064), 93–96.
- Izquierdo-Lahuerta, A.; Luis, O. de; Gómez-Esquer, F.; Cruces, J.; Coloma, A. (2016) *Gallus gallus* orthologous to human  $\alpha$ -dystroglycanopathies candidate genes: Gene expression and characterization during chicken embryogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **478** (3), 1043–1048.
- Jayasinha, V.; Nguyen, H. H.; Xia, B.; Kammesheidt, A.; Hoyte, K.; Martin, P. T. (2003) Inhibition of dystroglycan cleavage causes muscular dystrophy in transgenic mice. *Neuromuscul. Disord.*, **13** (5), 365–375.
- Jimenez-Mallebrera, C.; Torelli, S.; Feng, L.; Kim, J.; Godfrey, C.; Clement, E.; Mein, R.; *et al.* (2009) A comparative study of  $\alpha$ -dystroglycan glycosylation in dystroglycanopathies suggests that the hypoglycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan does not consistently correlate with clinical severity. *Brain Pathol.*, **19** (4), 596–611.
- Jing, J.; Lien, C. F.; Sharma, S.; Rice, J.; Brennan, P. A.; Górecki, D. C. (2004) Aberrant

- expression, processing and degradation of dystroglycan in squamous cell carcinomas. *Eur. J. Cancer*, **40** (14), 2143–2151.
- Jung, D.; Yang, B.; Meyer, J.; Chamberlain, J. S.; Campbell, K. P. (1995) Identification and characterization of the dystrophin-anchoring site on  $\beta$ -dystroglycan. *J. Biol. Chem.*, **270** (45), 27305–27310.
- Jurado, L. A.; Coloma, A.; Cruces, J. (1999) Identification of a human homolog of the *Drosophila rotated abdomen* gene (*POMT1*) encoding a putative protein O-mannosyl-transferase, and assignment to human chromosome 9q34.1. *Genomics*, **58** (2), 171–180.
- Kanagawa, M.; Kobayashi, K.; Tajiri, M.; Manya, H.; Kuga, A.; Yamaguchi, Y.; Akasaka-Manya, K.; *et al.* (2016) Identification of a post-translational modification with ribitol-phosphate and its defect in muscular dystrophy. *Cell Rep.*, **14** (9), 2209–2223.
- Kanagawa, M.; Nishimoto, A.; Chiyonobu, T.; Takeda, S.; Miyagoe-Suzuki, Y.; Wang, F.; Fujikake, N.; *et al.* (2009) Residual laminin-binding activity and enhanced dystroglycan glycosylation by LARGE in novel model mice to dystroglycanopathy. *Hum. Mol. Genet.*, **18** (4), 621–631.
- Kanagawa, M.; Omori, Y.; Sato, S.; Kobayashi, K.; Miyagoe-Suzuki, Y.; Takeda, S.; Endo, T.; *et al.* (2010) Post-translational maturation of dystroglycan is necessary for pikachurin binding and ribbon synaptic localization. *J. Biol. Chem.*, **285** (41), 31208–31216.
- Kanagawa, M.; Saito, F.; Kunz, S.; Yoshida-Moriguchi, T.; Barresi, R.; Kobayashi, Y. M.; Muschler, J.; *et al.* (2004) Molecular recognition by LARGE is essential for expression of functional dystroglycan. *Cell*, **117** (7), 953–964.
- Kim, D. S.; Hayashi, Y. K.; Matsumoto, H.; Ogawa, M.; Noguchi, S.; Murakami, N.; Sakuta, R.; *et al.* (2004) *POMT1* mutation results in defective glycosylation and loss of laminin-binding activity in  $\alpha$ -DG. *Neurology*, **62** (6), 1009–1011.
- Kislinger, T.; Gramolini, A. O.; Pan, Y.; Rahman, K.; MacLennan, D. H.; Emili, A. (2005) Proteome dynamics during C2C12 myoblast differentiation. *Mol. Cell. Proteomics*, **4** (7), 887–901.
- Klionsky, D. J.; Abdelmohsen, K.; Abe, A.; Abedin, M. J.; Abeliovich, H.; Arozena, A. A.; Adachi, H.; *et al.* (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, **12** (1), 1–222.
- Klionsky, D. J.; Eskelinen, E. L.; Deretic, V. (2014) Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... Wait, I'm confused. *Autophagy*, **10** (4), 549–551.
- Kobayashi, K.; Nakahori, Y.; Miyake, M.; Matsumura, K.; Kondo-Iida, E.; Nomura, Y.; Segawa, M.; *et al.* (1998) An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type



- congenital muscular dystrophy. *Nature*, **394** (July), 388–392.
- Kuchta, K.; Knizewski, L.; Wyrwicz, L. S.; Rychlewski, L.; Ginalska, K. (2009) Comprehensive classification of nucleotidyltransferase fold proteins: identification of novel families and their representatives in human. *Nucleic Acids Res.*, **37** (22), 7701–7714.
- Kurahashi, H.; Taniguchi, M.; Meno, C.; Taniguchi, Y.; Takeda, S.; Horie, M.; Otani, H.; *et al.* (2005) Basement membrane fragility underlies embryonic lethality in fukutin-null mice. *Neurobiol. Dis.*, **19** (1-2), 208–217.
- Langenbach, K. J.; Rando, T. A. (2002) Inhibition of dystroglycan binding to laminin disrupts the PI3K/AKT pathway and survival signaling in muscle cells. *Muscle and Nerve*, **26** (5), 644–653.
- Lee, J. K.; Matthews, R. T.; Lim, J. M.; Swanier, K.; Wells, L.; Pierce, J. M. (2012) Developmental expression of the neuron-specific N-acetylglucosaminyltransferase Vb (GnT-Vb/IX) and identification of its *in vivo* glycan products in comparison with those of its paralog, GnT-V. *J. Biol. Chem.*, **287** (34), 28526–28536.
- Lee, Y.; Kameya, S.; Cox, G. A.; Hsu, J.; Hicks, W.; Maddatu, T. P.; Smith, R. S.; *et al.* (2005) Ocular abnormalities in *Large<sup>myd</sup>* and *Large<sup>vl</sup>* mice, spontaneous models for muscle, eye, and brain diseases. *Mol. Cell. Neurosci.*, **30** (2), 160–172.
- Lehle, L.; Strahl, S.; Tanner, W. (2006) Protein glycosylation, conserved from yeast to man: A model organism helps elucidate congenital human diseases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **45** (41), 6802–6818.
- Leonoudakis, D.; Huang, G.; Akhavan, A.; Fata, J. E.; Singh, M.; Gray, J. W.; Muschler, J. L. (2014) Endocytic trafficking of laminin is controlled by dystroglycan and is disrupted in cancers. *J. Cell Sci.*, **127** (Pt 22), 4894–4903.
- Leonoudakis, D.; Singh, M.; Mohajer, R.; Mohajer, P.; Fata, J. E.; Campbell, K. P.; Muschler, J. L.; *et al.* (2010) Dystroglycan controls signaling of multiple hormones through modulation of STAT5 activity. *J. Cell Sci.*, **123** (21), 3683–3692.
- Lin, Y. Y.; White, R. J.; Torelli, S.; Cirak, S.; Muntoni, F.; Stemple, D. L. (2011) Zebrafish fukutin family proteins link the unfolded protein response with dystroglycanopathies. *Hum. Mol. Genet.*, **20** (9), 1763–1775.
- Liu, J.; Ball, S. L.; Yang, Y.; Mei, P.; Zhang, L.; Shi, H.; Kaminski, H. J.; *et al.* (2006) A genetic model for muscle-eye-brain disease in mice lacking protein O-mannose 1,2-N-acetylglucosaminyltransferase (POMGnT1). *Mech. Dev.*, **123** (3), 228–240.
- Lommel, M.; Winterhalter, P. R.; Willer, T.; Dahlhoff, M.; Schneider, M. R.; Bartels, M. F.; Renner-Müller, I.; *et al.* (2013) Protein O-mannosylation is crucial for E-cadherin-mediated cell adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **110** (52), 21024–21029.
- Loop, F. T. L. Van Der; Eys, G. J. J. M. Van; Schaart, G.; Ramaekers, F. C. S. (1996) Titin

- expression as an early indication of heart and skeletal muscle differentiation in vitro. Developmental re-organisation in relation to cytoskeletal constituents. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, **17** (1), 23–36.
- Lu, P. J.; Zillmer, A.; Wu, X.; Lochmuller, H.; Vachris, J.; Blake, D.; Chan, Y. M.; *et al.* (2010) Mutations alter secretion of fukutin-related protein. *Biochim. Biophys. Acta*, **1802** (2), 253–258.
- Lunardi, A.; Cremisi, F.; Dente, L. (2006) Dystroglycan is required for proper retinal layering. *Dev. Biol.*, **290** (2), 411–20.
- Manya, H.; Akasaka-Manya, K.; Nakajima, A.; Kawakita, M.; Endo, T. (2010) Role of N-glycans in maintaining the activity of protein O-mannosyltransferases POMT1 and POMT2. *J. Biochem.*, **147** (3), 337–344.
- Manya, H.; Chiba, A.; Yoshida, A.; Wang, X.; Chiba, Y.; Jigami, Y.; Margolis, R. U.; *et al.* (2004) Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101** (2), 500–505.
- Manzini, M. C.; Tambunan, D. E.; Hill, R. S.; Yu, T. W.; Maynard, T. M.; Heinzen, E. L.; Shianna, K. V.; *et al.* (2012) Exome sequencing and functional validation in zebrafish identify *GTDC2* mutations as a cause of Walker-Warburg syndrome. *Am. J. Hum. Genet.*, **91** (3), 541–547.
- Martín-Blanco, E.; García-Bellido, A. (1996) Mutations in the rotated abdomen locus affect muscle development and reveal an intrinsic asymmetry in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93** (12), 6048–6052.
- Martinez, H. R.; Craigen, W. J.; Ummat, M.; Adesina, A. M.; Lotze, T. E.; Jefferies, J. L. (2014) Novel cardiovascular findings in association with a *POMT2* mutation: three siblings with  $\alpha$ -dystroglycanopathy. *Eur. J. Hum. Genet.*, **22** (4), 486–491.
- Matsumoto, H.; Noguchi, S.; Sugie, K.; Ogawa, M.; Murayama, K.; Hayashi, Y. K.; Nishino, I. (2004) Subcellular localization of fukutin and fukutin-related protein in muscle cells. *J. Biochem.*, **135** (6), 709–712.
- Matsumura, K.; Arai, K.; Zhong, D.; Saito, F.; Fukuta-Ohi, H.; Maekawa, R.; Yamada, H.; *et al.* (2003) Disruption of dystroglycan axis by  $\beta$ -dystroglycan processing in cardiomyopathic hamster muscle. *Neuromuscul. Disord.*, **13** (10), 796–803.
- Matsumura, K.; Ohlendieck, K.; Ionasescu, V. V.; Tomé, F. M. S.; Nonaka, I.; Burghes, A. H. M.; Mora, M.; *et al.* (1993) The role of the dystrophin-glycoprotein complex in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies. *Neuromuscul. Disord.*, **3** (5–6), 533–535.



- McDearmon, E. L.; Combs, A. C.; Ervasti, J. M. (2003) Core 1 glycans on  $\alpha$ -dystroglycan mediate laminin-induced acetylcholine receptor clustering but not laminin binding. *J. Biol. Chem.*, **278** (45), 44868–44873.
- McDearmon, E. L.; Combs, A. C.; Sekiguchi, K.; Fujiwara, H.; Ervasti, J. M. (2006) Brain  $\alpha$ -dystroglycan displays unique glycoepitopes and preferential binding to laminin-10/11. *FEBS Lett.*, **580** (14), 3381–3385.
- Mercuri, E.; Brockington, M.; Straub, V.; Quijano-Roy, S.; Yuva, Y.; Herrmann, R.; Brown, S. C.; *et al.* (2003) Phenotypic spectrum associated with mutations in the fukutin-related protein gene. *Ann. Neurol.*, **53** (4), 537–542.
- Mercuri, E.; Messina, S.; Bruno, C.; Mora, M.; Pegoraro, E.; Comi, G. P.; D'Amico, A.; *et al.* (2009) Congenital muscular dystrophies with defective glycosylation of dystroglycan: A population study. *Neurology*, **72** (21), 1802–1809.
- Messina, S.; Mora, M.; Pegoraro, E.; Pini, A.; Mongini, T.; D'Amico, A.; Pane, M.; *et al.* (2008) *POMT1* and *POMT2* mutations in CMD patients: A multicentric Italian study. *Neuromuscul. Disord.*, **18** (7), 565–571.
- Michele, D. E.; Barresi, R.; Kanagawa, M.; Saito, F.; Kelley, R. I.; Somerk, H.; Straub, V.; *et al.* (2002) Post-translational disruption of dystroglycan–ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature*, **418** (6896), 417–422.
- Mohamed, J. S.; Lopez, M. A.; Cox, G. A.; Boriek, A. M. (2013) Ankyrin Repeat Domain Protein 2 and Inhibitor of DNA Binding 3 Cooperatively Inhibit Myoblast Differentiation by Physical Interaction, *J. Biol. Chem.*, **288** (34), 24560–68.
- Moore, C. J.; Goh, H. T.; Hewitt, J. E. (2008) Genes required for functional glycosylation of dystroglycan are conserved in zebrafish. *Genomics*, **92** (3), 159–167.
- Moran, J. L.; Li, Y.; Hill, A. A.; Mounts, W. M.; Miller, C. P. (2002) Gene expression changes during mouse skeletal myoblast differentiation revealed by transcriptional profiling. *Physiol. Genomics*, **10** (2), 103–111.
- Morita, I.; Kizuka, Y.; Kakuda, S.; Oka, S. (2008) Expression and function of the HNK-1 carbohydrate. *J. Biochem.*, **143** (6), 719–724.
- Ng, S. B.; Buckingham, K. J.; Lee, C.; Bigham, A. W.; Tabor, H. K.; Dent, K. M.; Huff, C. D.; *et al.* (2010) Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. *Nat. Genet.*, **42** (1), 30–35.
- Nilsson, J.; Nilsson, J.; Larson, G.; Grahn, A. (2010) Characterization of site-specific O-glycan structures within the mucin-like domain of  $\alpha$ -dystroglycan from human skeletal muscle. *Glycobiology*, **20** (9), 1160–1169.
- Nishida, A.; Furukawa, A.; Koike, C.; Tano, Y.; Aizawa, S.; Matsuo, I.; Furukawa, T. (2003) *Otx2* homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland

- development. *Nat. Neurosci.*, **6** (12), 1255–1263.
- Omori, Y.; Araki, F.; Chaya, T.; Kajimura, N.; Irie, S.; Terada, K.; Muranishi, Y.; *et al.* (2012) Presynaptic dystroglycan-pikachurin complex regulates the proper synaptic connection between retinal photoreceptor and bipolar cells. *J. Neurosci.*, **32** (18), 6126–6137.
- Pallavicini, A.; Kojić, S.; Bean, C.; Vainzof, M.; Salamon, M.; Ievolella, C.; Bortoletto, G.; *et al.* (2001) Characterization of human skeletal muscle Ankrd2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **285** (2), 378–86.
- Patterson, S. E.; Bird, N. C.; Devoto, S. H. (2010) BMP regulation of myogenesis in zebrafish. *Dev. Dyn.*, **239** (3), 806–817.
- Pillers, D.-A. M.; Weleber, R. G.; Green, D. G.; Rash, S. M.; Dally, G. Y.; Howard, P. L.; Powers, M. R.; *et al.* (1999) Effects of dystrophin isoforms on signal transduction through neural retina: genotype-phenotype analysis of Duchenne muscular dystrophy mouse mutants. *Mol. Genet. Metab.*, **66** (2), 100–110.
- Poppe, M.; Cree, L.; Bourke, J.; Eagle, M.; Anderson, L.; Birchall, D.; Brockington, M.; *et al.* (2003) The phenotype of limb-girdle muscular dystrophy type 2I. *Neurology*, **60** (8), 1246–1251.
- Porrello, A.; Cerone, M. A.; Coen, S.; Gurtner, A.; Fontemaggi, G.; Cimino, L.; Piaggio, G.; *et al.* (2000) p53 regulates myogenesis by triggering the differentiation activity of pRb. *J. Cell Biol.*, **151** (6), 1295–1303.
- Potthoff, M. J.; Arnold, M.; McAnally, J.; Richardson, J.; Bassel-Duby, R.; Olson, E. N. (2007) Regulation of skeletal muscle sarcomere integrity and postnatal muscle function by Mef2c. *Mol. Cell. Biol.*, **27** (23), 8143–8151.
- Poulton, J. S.; Deng, W.-M. (2006) Dystroglycan down-regulation links EGF receptor signaling and anterior-posterior polarity formation in the Drosophila oocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103** (34), 12775–12780.
- Prados, B.; Peña, A.; Cotarelo, R. P.; Valero, M. C.; Cruces, J. (2007) Expression of the murine *Pomt1* gene in both the developing brain and adult muscle tissues and its relationship with clinical aspects of Walker-Warburg syndrome. *Am. J. Pathol.*, **170** (5), 1659–1668.
- Praissman, J. L.; Live, D. H.; Wang, S.; Ramiah, A.; Chinoy, Z. S.; Boons, G.-J.; Moremen, K. W.; *et al.* (2014) B4GAT1 is the priming enzyme for the LARGE-dependent functional glycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan. *eLife*, **3**, e03943.
- Praissman, J. L.; Willer, T.; Sheikh, M. O.; Toi, A.; Chitayat, D.; Lin, Y.-Y.; Lee, H.; *et al.* (2016) The functional O-mannose glycan on  $\alpha$ -dystroglycan contains a phospho-ribitol primed for matriglycan addition. *eLife*, **5**, e14473.
- Raducu, M.; Baets, J.; Fano, O.; Coster, R. Van; Cruces, J. (2012) Promoter alteration causes

- transcriptional repression of the *POMGNT1* gene in limb-girdle muscular dystrophy type 20. *Eur. J. Hum. Genet.*, **20** (9), 945–52.
- Rafii, M. S.; Hagiwara, H.; Mercado, M. L.; Seo, N. S.; Xu, T.; Dugan, T.; Owens, R. T.; *et al.* (2006) Biglycan Binds to  $\alpha$ - and  $\gamma$ -sarcoglycan and regulates their expression during development. *J. Cell. Physiol.*, **209** (1), 439–447.
- Rahimov, F.; Kunkel, L. M. (2013) The cell biology of disease: cellular and molecular mechanisms underlying muscular dystrophy. *J. Cell Biol.*, **201** (4), 499–510.
- Raman, J.; Guan, Y.; Perrine, C. L.; Gerken, T. A.; Tabak, L. A. (2012) UDP-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine: polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases: Completion of the family tree. *Glycobiology*, **22** (6), 768–777.
- Rambukkana, A.; Yamada, H.; Zanazzi, G.; Mathus, T.; Salzer, J. L.; Yurchenco, P. D.; Campbell, K. P.; *et al.* (1998) Role of  $\alpha$ -dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science*, **282** (5396), 2076–2079.
- Reissner, C.; Stahn, J.; Breuer, D.; Klose, M.; Pohlentz, G.; Mormann, M.; Missler, M. (2014) Dystroglycan binding to  $\alpha$ -neurexin competes with neurexophilin-1 and neuroligin in the brain. *J. Biol. Chem.*, **289** (40), 27585–27603.
- Rentschler, S.; Linn, H.; Deininger, K.; Bedford, M. T.; Espanel, X.; Sudol, M. (1999) The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with  $\beta$ -dystroglycan. *Biol. Chem.*, **380** (4), 431–442.
- Reynaud-Deonauth, S.; Zhang, H.; Afouda, A.; Taillefert, S.; Beatus, P.; Kloc, M.; Etkin, L. D.; *et al.* (2002) Notch signaling is involved in the regulation of *Id3* gene transcription during *Xenopus* embryogenesis. *Differentiation*, **69** (4–5), 198–208.
- Riemersma, M.; Froese, D. S.; Tol, W. Van; Engelke, U. F.; Kopec, J.; Scherpenzeel, M. Van; Ashikov, A.; *et al.* (2015a) Human ISPD is a cytidyltransferase required for dystroglycan *O*-mannosylation. *Chem. Biol.*, **22** (12), 1643–1652.
- Riemersma, M.; Mandel, H.; van Beusekom, E.; Gazzoli, I.; Roscioli, T.; Eran, A.; Willemsen, M. A.; *et al.* (2015b) Absence of  $\alpha$ - and  $\beta$ -dystroglycan is associated with Walker-Warburg syndrome. *Neurology*, **84** (21), 2177–2182.
- Rosa, M. C. De; Pirolli, D.; Bozzi, M.; Sciandra, F.; Giardina, B.; Brancaccio, A. (2011) A second Ig-like domain identified in dystroglycan by molecular modelling and dynamics. *J. Mol. Graph. Model.*, **29** (8), 1015–1024.
- Russo, K.; Stasio, E. Di; Macchia, G.; Rosa, G.; Brancaccio, A.; Petrucci, T. C. (2000) Characterization of the  $\beta$ -dystroglycan-growth factor receptor 2 (Grb2) interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **274** (1), 93–98.
- Saito, F.; Blank, M.; Schröder, J.; Manya, H.; Shimizu, T.; Campbell, K. P.; Endo, T.; *et al.*

- (2005) Aberrant glycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan causes defective binding of laminin in the muscle of chicken muscular dystrophy. *FEBS Lett.*, **579** (11), 2359–2363.
- Saito, F.; Kanagawa, M.; Ikeda, M.; Hagiwara, H.; Masaki, T.; Ohkuma, H.; Katanosaka, Y.; *et al.* (2014) Overexpression of LARGE suppresses muscle regeneration via down-regulation of insulin-like growth factor 1 and aggravates muscular dystrophy in mice. *Hum. Mol. Genet.*, **23** (17), 4543–4558.
- Saito, F.; Saito-Arai, Y.; Nakamura-Okuma, A.; Ikeda, M.; Hagiwara, H.; Masaki, T.; Shimizu, T.; *et al.* (2011) Secretion of N-terminal domain of  $\alpha$ -dystroglycan in cerebrospinal fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **411** (2), 365–369.
- Saito, F.; Saito-Arai, Y.; Nakamura, A.; Shimizu, T.; Matsumura, K. (2008) Processing and secretion of the N-terminal domain of  $\alpha$ -dystroglycan in cell culture media. *FEBS Lett.*, **582** (3), 439–444.
- Sakamoto, K.; Yamaguchi, S.; Ando, R.; Miyawaki, A.; Kabasawa, Y.; Takagi, M.; Li, C. L.; *et al.* (2002) The nephroblastoma overexpressed gene (NOV/ccn3) protein associates with Notch1 extracellular domain and inhibits myoblast differentiation via Notch signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, **277** (33), 29399–29405.
- Sanjana, N. E.; Cong, L.; Zhou, Y.; Cunniff, M. M.; Feng, G.; Zhang, F. (2012) A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nat. Protoc.*, **7** (1), 171–192.
- Sasaki, T.; Yamada, H.; Matsumura, K.; Shimizu, T.; Kobata, A.; Endo, T. (1998) Detection of O-mannosyl glycans in rabbit skeletal muscle  $\alpha$ -dystroglycan. *Biochim. Biophys. Acta*, **1425** (3), 599–606.
- Sato, S.; Omori, Y.; Katoh, K.; Kondo, M.; Kanagawa, M.; Miyata, K.; Funabiki, K.; *et al.* (2008) Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. *Nat. Neurosci.*, **11** (8), 923–931.
- Satz, J. S.; Barresi, R.; Durbeej, M.; Willer, T.; Turner, A.; Moore, S. a; Campbell, K. P.; *et al.* (2008) Brain and eye malformations resembling Walker-Warburg syndrome are recapitulated in mice by dystroglycan deletion in the epiblast. *J. Neurosci.*, **28** (42), 10567–10575.
- Satz, J. S.; Philp, A. R.; Nguyen, H.; Kusano, H.; Lee, J.; Turk, R.; Riker, M. J.; *et al.* (2009) Visual impairment in the absence of dystroglycan. *J. Neurosci.*, **29** (42), 13136–13146.
- Sauer, B.; Henderson, N. (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85** (14), 5166–5170.
- Sciandra, F.; Schneider, M.; Giardina, B.; Baumgartner, S.; Petrucci, T. C.; Brancaccio, A. (2001) Identification of the  $\beta$ -dystroglycan binding epitope within the C-terminal

- region of  $\alpha$ -dystroglycan. *Eur. J. Biochem.*, **268** (16), 4590–4597.
- Sentandreu, R.; Northcote, D. H. (1969) The characterization of oligosaccharides attached to threonine and serine in a mannan glycopeptide obtained from the cell wall of yeast. *Carbohydr. Res.*, **10**, 584–585.
- Singh, J.; Itahana, Y.; Knight-Krajewski, S.; Kanagawa, M.; Campbell, K. P.; Bissell, M. J.; Muschler, J. (2004) Proteolytic enzymes and altered glycosylation modulate dystroglycan function in carcinoma cells. *Cancer Res.*, **64** (17), 6152–6159.
- Sirour, C.; Hidalgo, M.; Bello, V.; Buisson, N.; Darribère, T.; Moreau, N. (2011) Dystroglycan is involved in skin morphogenesis downstream of the Notch signaling pathway. *Mol. Biol. Cell*, **22** (16), 2957–69.
- Smalheiser, N. R.; Haslam, S. M.; Sutton-Smith, M.; Morris, H. R.; Dell, A. (1998) Structural analysis of sequences O-linked to mannose reveals a novel Lewis X structure in cranin (dystroglycan) purified from sheep brain. *J. Biol. Chem.*, **273** (37), 23698–23703.
- Smalheiser, N. R.; Schwartz, N. B. (1987) Cranin: a laminin-binding protein of cell membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84** (18), 6457–6461.
- Spiro, R. G. (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology*, **12** (4), 43R–56R.
- Stalnaker, S. H.; Aoki, K.; Lim, J. M.; Porterfield, M.; Liu, M.; Satz, J. S.; Buskirk, S.; *et al.* (2011) Glycomic analyses of mouse models of congenital muscular dystrophy. *J. Biol. Chem.*, **286** (24), 21180–21190.
- Stalnaker, S. H.; Hashmi, S.; Lim, J. M.; Aoki, K.; Porterfield, M.; Gutierrez-Sanchez, G.; Wheeler, J.; *et al.* (2010) Site mapping and characterization of O-glycan structures on  $\alpha$ -dystroglycan isolated from rabbit skeletal muscle. *J. Biol. Chem.*, **285** (32), 24882–24891.
- Sternberg, N.; Hamilton, D. (1981) Bacteriophage P1 site-specific recombination. *J. Mol. Biol.*, **150** (4), 467–486.
- Stevens, E.; Carss, K. J.; Cirak, S.; Foley, A. R.; Torelli, S.; Willer, T.; Tambunan, D. E.; *et al.* (2013a) Mutations in *B3GALNT2* cause congenital muscular dystrophy and hypoglycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan. *Am. J. Hum. Genet.*, **92** (3), 354–365.
- Stevens, E.; Torelli, S.; Feng, L.; Phadke, R.; Walter, M. C.; Schneiderat, P.; Eddaoudi, A.; *et al.* (2013b) Flow cytometry for the analysis of  $\alpha$ -dystroglycan glycosylation in fibroblasts from patients with dystroglycanopathies. *PLoS One*, **8** (7), e68958.
- Strahl-Bolsinger, S.; Scheinost, A. (1999) Transmembrane topology of Pmt1p, a member of an evolutionarily conserved family of protein O-mannosyltransferases. *J. Biol. Chem.*, **274** (13), 9068–9075.
- Sugie, K.; Noguchi, S.; Kozuka, Y.; Arikawa-Hirasawa, E.; Tanaka, M.; Yan, C.; Saftig, P.; *et al.*

- (2005) Autophagic vacuoles with sarcolemmal features delineate Danon disease and related myopathies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **64** (6), 513–522.
- Sveen, M.-L.; Schwartz, M.; Vissing, J. (2006) High prevalence and phenotype-genotype correlations of limb girdle muscular dystrophy type 2I in Denmark. *Ann. Neurol.*, **59** (5), 808–815.
- Tabak, L. A. (2010) The role of mucin-type O-glycans in eukaryotic development. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **21** (6), 616–621.
- Tachikawa, M.; Kanagawa, M.; Yu, C. C.; Kobayashi, K.; Toda, T. (2012) Mislocalization of fukutin protein by disease-causing missense mutations can be rescued with treatments directed at folding amelioration. *J. Biol. Chem.*, **287** (11), 8398–8406.
- Takeda, S.; Kondo, M.; Sasaki, J.; Kurahashi, H.; Kano, H.; Arai, K.; Misaki, K.; *et al.* (2003) Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histogenesis and normal eye development. *Hum. Mol. Genet.*, **12** (12), 1449–1459.
- Taniguchi-Ikeda, M.; Morioka, I.; Iijima, K.; Toda, T. (2016) Mechanistic aspects of the formation of  $\alpha$ -dystroglycan and therapeutic research for the treatment of  $\alpha$ -dystroglycanopathy: A review. *Mol. Aspects Med.*, **51**, 115–124.
- Tasca, G.; Moro, F.; Aiello, C.; Cassandrini, D.; Fiorillo, C.; Bertini, E.; Bruno, C.; *et al.* (2013) Limb-girdle muscular dystrophy with  $\alpha$ -dystroglycan deficiency and mutations in the *ISPD* gene. *Neurology*, **80** (10), 963–965.
- Taylor, M. E.; Drickamer, K. (2007) Paradigms for glycan-binding receptors in cell adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **19** (5), 572–577.
- Thornhill, P.; Bassett, D.; Lochmüller, H.; Bushby, K.; Straub, V. (2008) Developmental defects in a zebrafish model for muscular dystrophies associated with the loss of fukutin-related protein (FKRP). *Brain*, **131** (6), 1551–1561.
- Tian, Y.; Li, Z.; Hu, W.; Ren, H.; Tian, E.; Zhao, Y.; Lu, Q.; *et al.* (2010) *C. elegans* screen identifies autophagy genes specific to multicellular organisms. *Cell*, **141** (6), 1042–1055.
- Torelli, S.; Brown, S. C.; Brockington, M.; Dolatshad, N. F.; Jimenez, C.; Skordis, L.; Feng, L. H.; *et al.* (2005) Sub-cellular localisation of fukutin related protein in different cell lines and in the muscle of patients with MDC1C and LGMD2I. *Neuromuscul. Disord.*, **15** (12), 836–843.
- Tran, D. T.; Lim, J. M.; Liu, M.; Stalnaker, S. H.; Wells, L.; Hagen, K. G. Ten; Live, D. (2012) Glycosylation of  $\alpha$ -dystroglycan: O-mannosylation influences the subsequent addition of GalNAc by UDP-GalNAc polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases. *J. Biol. Chem.*, **287** (25), 20967–20974.
- van Reeuwijk, J.; Olderode-Berends, M. J. W.; Elzen, C. Van den; Brouwer, O. F.; Roscioli, T.;



- Pampus, M. G. Van; Scheffer, H.; *et al.* (2010) A homozygous *FKRP* start codon mutation is associated with Walker-Warburg syndrome, the severe end of the clinical spectrum. *Clin. Genet.*, **78** (3), 275–281.
- Vester-Christensen, M. B.; Halim, A.; Joshi, H. J.; Steentoft, C.; Bennett, E. P.; Levery, S. B.; Vakhrushev, S. Y.; *et al.* (2013) Mining the O-mannose glycoproteome reveals cadherins as major O-mannosylated glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **110**, 21018–21023.
- von Renesse, A.; Petkova, M. V.; Lützkendorf, S.; Heinemeyer, J.; Gill, E.; Hübner, C.; Moers, A. von; *et al.* (2014) *POMK* mutation in a family with congenital muscular dystrophy with merosin deficiency, hypomyelination, mild hearing deficit and intellectual disability. *J. Med. Genet.*, **51** (4), 275–282.
- Vuillaumier-Barrot, S.; Bouchet-Séraphin, C.; Chelbi, M.; Devisme, L.; Quentin, S.; Gazal, S.; Laquerrière, A.; *et al.* (2012) Identification of mutations in *TMEM5* and *ISPD* as a cause of severe cobblestone lissencephaly. *Am. J. Hum. Genet.*, **91** (6), 1135–1143.
- Vuillaumier-Barrot, S.; Quijano-Roy, S.; Bouchet-Seraphin, C.; Maugenre, S.; Peudener, S.; Bergh, P. Van den; Marcorelles, P.; *et al.* (2009) Four Caucasian patients with mutations in the fukutin gene and variable clinical phenotype. *Neuromuscul. Disord.*, **19** (3), 182–8.
- Waite, A.; Tinsley, C. L.; Locke, M.; Blake, D. J. (2009) The neurobiology of the dystrophin-associated glycoprotein complex. *Ann. Med.*, **41** (5), 344–459.
- Wang, Z.; Miao, G.; Xue, X.; Guo, X.; Yuan, C.; Wang, Z.; Zhang, G.; *et al.* (2016) The Vici syndrome protein EPG5 is a Rab7 effector that determines the fusion specificity of autophagosomes with late endosomes/lysosomes. *Mol. Cell*, **63** (5), 781–795.
- Whitmore, C.; Fernandez-Fuente, M.; Booler, H.; Parr, C.; Kavishwar, M.; Ashraf, A.; Lacey, E.; *et al.* (2014) The transgenic expression of *LARGE* exacerbates the muscle phenotype of dystroglycanopathy mice. *Hum. Mol. Genet.*, **23** (7), 1842–1855.
- Willer, T.; Lee, H.; Lommel, M.; Yoshida-Moriguchi, T.; Bernabe, D. B. V. de; Venzke, D.; Cirak, S.; *et al.* (2012) *ISPD* loss-of-function mutations disrupt dystroglycan O-mannosylation and cause Walker-Warburg syndrome. *Nat. Genet.*, **44** (5), 575–580.
- Willer, T.; Prados, B.; Falcón-Pérez, J. M.; Renner-Müller, I.; Przemeck, G. K. H.; Lommel, M.; Coloma, A.; *et al.* (2004) Targeted disruption of the Walker-Warburg syndrome gene *Pomtl* in mouse results in embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101** (39), 14126–14131.
- Williamson, R. A.; Henry, M. D.; Daniels, K. J.; Hrstka, R. F.; Lee, J. C.; Sunada, Y.; Ibraghimov-Beskrovnaya, O.; *et al.* (1997) Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in *Dag1*-null mice. *Hum. Mol. Genet.*,

- 6 (6), 831–841.
- Wright, K. M.; Lyon, K. A.; Leung, H.; Leahy, D. J.; Ma, L.; Ginty, D. D. (2012) Dystroglycan organizes axon guidance cue localization and axonal pathfinding. *Neuron*, **76** (5), 931–944.
- Xiong, H.; Kobayashi, K.; Tachikawa, M.; Many, H.; Takeda, S.; Chiyonobu, T.; Fujikake, N.; *et al.* (2006) Molecular interaction between fukutin and POMGnT1 in the glycosylation pathway of  $\alpha$ -dystroglycan. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **350** (4), 935–941.
- Yamada, H.; Chiba, A.; Endo, T.; Kobata, A.; Anderson, V. B.; Hori, H.; Fukutaohi, H.; *et al.* (1996) Characterization of dystroglycan-laminin interaction in peripheral nerve. *J. Neurochem.*, **66** (4), 1518–1524.
- Yamada, H.; Saito, F.; Fukuta-Ohi, H.; Zhong, D.; Hase, A.; Arai, K.; Okuyama, A.; *et al.* (2001) Processing of  $\beta$ -dystroglycan by matrix metalloproteinase disrupts the link between the extracellular matrix and cell membrane via the dystroglycan complex. *Hum. Mol. Genet.*, **10** (15), 1563–1569.
- Yamada, H.; Shimizu, T.; Tanaka, T.; Campbell, K. P.; Matsumura, K. (1994) Dystroglycan is a binding protein of laminin and merosin in peripheral nerve. *FEBS Lett.*, **352** (1), 49–53.
- Yamamoto, T.; Kato, Y.; Shibata, N.; Sawada, T.; Osawa, M.; Kobayashi, M. (2008) A role of fukutin, a gene responsible for Fukuyama type congenital muscular dystrophy, in cancer cells: a possible role to suppress cell proliferation. *Int. J. Exp. Pathol.*, **89** (5), 332–341.
- Yanagisawa, A.; Bouchet, C.; Quijano-Roy, S.; Vuillaumier-Barrot, S.; Clarke, N.; Odent, S.; Rodriguez, D.; *et al.* (2009) *POMT2* intragenic deletions and splicing abnormalities causing congenital muscular dystrophy with mental retardation. *Eur. J. Med. Genet.*, **52** (4), 201–206.
- Yoshida-Moriguchi, T.; Campbell, K. P. (2015) Matriglycan: a novel polysaccharide that links dystroglycan to the basement membrane. *Glycobiology*, **25** (7), 702–713.
- Yoshida-Moriguchi, T.; Willer, T.; Anderson, M. E.; Venzke, D.; Whyte, T.; Muntoni, F.; Lee, H.; *et al.* (2013) SGK196 is a glycosylation-specific O-mannose kinase required for dystroglycan function. *Science*, **341** (6148), 896–899.
- Yoshida-Moriguchi, T.; Yu, L.; Stalnaker, S. H.; Davis, S.; Kunz, S.; Madson, M.; Oldstone, M. B. A.; *et al.* (2010) O-mannosyl phosphorylation of  $\alpha$ -dystroglycan is required for laminin binding. *Science*, **327** (5961), 88–92.
- Young, B.; Eggenberger, E.; Kaufman, D. (2012) Current electrophysiology in ophthalmology: a review. *Curr. Opin. Ophthalmol.*, **23** (6), 497–505.
- Yuen, C. T.; Chai, W.; Loveless, R. W.; Lawson, A. M.; Margolis, R. U.; Feizi, T. (1997) Brain



- contains HNK-1 immunoreactive O-glycans of the sulfoglucuronyl lactosamine series that terminate in 2-linked or 2,6-linked hexose (mannose). *J. Biol. Chem.*, **272** (14), 8924–8931.
- Zhao, H.; Zhao, Y. G.; Wang, X.; Xu, L.; Miao, L.; Feng, D.; Chen, Q.; *et al.* (2013) Mice deficient in *Epg5* exhibit selective neuronal vulnerability to degeneration. *J. Cell Biol.*, **200** (6), 731–741.
- Zhou, Y. W.; Thomason, D. B.; Gullberg, D.; Jarrett, H. W. (2006) Binding of laminin  $\alpha$ 1-chain LG4-5 domain to  $\alpha$ -dystroglycan causes tyrosine phosphorylation of syntrophin to initiate Rac1 signaling. *Biochemistry*, **45** (7), 2042–2052.
- Zou, W.; Wang, X.; Vale, R.; Ou, G. (2012) Autophagy genes promote apoptotic cell corpse clearance. *Autophagy*, **8** (8), 1267–1268.

## *Anexo 1*

Tabla 34. Resumen de las características clínicas de las MDDGAs

Clásica	WWS	MEB	FCMD
<b>Afectación muscular</b>	Contracturas congénitas Distrofia muscular congénita Hipotonía muscular severa	Hipotonía generalizada y severa Debilidad muscular generalizada Distrofia muscular Espasticidad	Hipertrofia de las pantorrillas Distrofia muscular congénita Debilidad muscular Hipotonía muscular Atrofia muscular
	La biopsia muscular muestra un descenso o ausencia de la glicosilación del $\alpha$ -DG	La biopsia muscular muestra un descenso o ausencia de la glicosilación del $\alpha$ -DG	La biopsia muscular muestra un descenso o ausencia de la glicosilación del $\alpha$ -DG
<b>Afectación ocular</b>	Ceguera Bftalmos Cataratas Coloboma Opacidad corneal Megalocórnea Microftalmia Miopía Hipoplasia del nervio óptico Anomalía de Peters Atrofia retiniana Desprendimiento de retina Displasia retiniana Malformación de la retina	Electrorretinograma (ERG) disminuido o ausente Bftalmos Cataratas Coloboma Miopía congénita Megalocórnea Microftalmia Nistagmo Opacidad corneal Atrofia óptica Atrofia retiniana Degeneración de la retina Displasia retiniana Hipoplasia retiniana	Cataratas Hipermetropía Microftalmia Miopía Atrofia óptica Desprendimiento de la retina Displasia retiniana Estrabismo
<b>Afectación del Sistema Nervioso</b>	Agenesia o hipoplasia del cuerpo calloso Displasia cerebelosa Hipoplasia cerebelosa Malformación de Dandy-Walker Retraso generalizado del desarrollo Hidrocefalia Hipoplasia del tronco encefálico Discapacidad intelectual grave o profunda Meningoencefalocele Microcefalia Encefalocele occipital Paquigiria Polimicrogiria Convulsiones Adelgazamiento corteza cerebral Lisencefalia tipo II	Quiste cerebeloso Displasia cerebelosa Hipoplasia cerebelosa Anomalías en el electroencefalograma (EEG) Hidrocefalia Hipoplasia del tronco encefálico Discapacidad intelectual, profunda o grave Microcefalia Mioclonus Paquigiria Polimicrogiria Convulsiones Retraso generalizado del desarrollo Lisencefalia tipo II Ventriculomegalia	Agenesia del cuerpo calloso Arreflexia Quiste cerebeloso Hipoplasia cerebelosa Encefalocele Respuesta de alarma exagerada Holoprosencefalia Hidrocefalia Hipoplasia del tronco encefálico Hipoplasia del tracto piramidal Discapacidad intelectual Paquigiria Polimicrogiria Convulsiones Lisencefalia tipo II
<b>Parámetros bioquímicos</b>	Incremento de la creatina quinasa sérica	Incremento de la creatina quinasa sérica	Incremento de la creatina quinasa sérica
<b>Esperanza de vida</b>	Inferior a 3 años	Entre 10 y 30 años	Entre 2 y 30 años

Tabla 35. Resumen de las características clínicas de las MDDGBs y MDDGCs

OMIM Clásica	MDDGB CMD	MDDGC LGMD
<b>Afectación muscular</b>	Hipotonía congénita Hipertrofia muscular Debilidad muscular (generalizada, difusa o proximal) Distrofia muscular	Distrofia muscular de cinturas Dificultad para caminar, correr o subir escaleras Signo de Gower Hipertrofia de las pantorrillas
	Cambios distróficos en biopsia muscular La biopsia muscular muestra ausencia o descenso de la glicosilación del $\alpha$ -DG	Cambios distróficos en biopsia muscular La biopsia muscular muestra ausencia o descenso de la glicosilación del $\alpha$ -DG
<b>Afectación ocular</b>	Miopía Cataratas Estrabismo Respuesta en electroretinograma (ERG) disminuida Nistagmo	Miopía (1 paciente) Cataratas (1 paciente) Nistagmo (1 paciente)
<b>Afectación del sistema nervioso</b>	Retraso mental, en diferentes grados. Alteración de la sustancia blanca Afectación cerebelosa (hipoplasia, displasia, quistes) Hipoplasia del cuerpo caloso Retraso en el desarrollo motor	Retraso mental, leve o moderado (puede no darse). Retraso en el desarrollo motor No hay alteraciones estructurales
<b>Parámetros bioquímicos</b>	Creatina quinasa sérica aumentada	Creatina quinasa sérica aumentada
<b>Esperanza de vida</b>	Variable	20-30 años – normal

Tabla. 36. Mutaciones encontradas por exoma en el paciente 1 para genes candidatos de distroglicanopatía

Gene	Ref	Obs	State	Func	ExonicFunc	AACChange
AGRN	T	C	hom	splicing	NM_198576:exon7: c.1178-6T>C)	
AGRN	C	T	hom	splicing	NM_198576:exon33: c.5651+5C>T)	
AGRN	A	G	het	exonic	nsyn_SNV	AGRN:NM_198576:exon34: c.A5753G:p.Y1918C
ALG6	C	T	hom	exonic	nsyn_SNV	ALG6:NM_013339:exon11: c.C911T:p.S304F
ALG9	C	T	hom	exonic	nsyn_SNV	ALG9:NM_001077691:exon8: c.G352A:p.V118I ALG9:NM_001077690:exon9: c.G865A:p.V289I
ALG9	G	-	hom	splicing	NM_001077690:exon2: c.60+1C>- NM_001077690:exon3: c.61-1C>-	
B3GALT	C	T	het	splicing	NM_194318:exon5: c.347+4C>T)	
B3GALT	G	A	het	exonic	nsyn_SNV	B3GALT:NM_194318:exon13: c.G1108A:p.E370K
B4GALNT2	G	A	het	exonic	nsyn_SNV	B4GALNT2:NM_153446:exon1: c.G82A:p.E28K
COG1	A	G	het	exonic	nsyn_SNV	COG1:NM_018714:exon6: c.A1175G:p.N392S
COG4	G	A	hom	exonic	nsyn_SNV	COG4:NM_001195139:exon4:c. C485T:p.T162I
COG5	A	G	het	exonic	nsyn_SNV	COG5:NM_001161520:exon9:c. T988C:p.F330L
COG6	G	A	het	exonic	nsyn_SNV	COG6:NM_001145079:exon1:c. G28A:p.A10T
COG6	T	A	het	exonic	nsyn_SNV	COG6:NM_001145079:exon1:c. T94A:p.C32S
COG6	A	-	het	splicing	NM_001145079:exon17: c.1693-6A>-	
COL4A1	T	G	het	exonic	nsyn_SNV	COL4A1:NM_001845:exon45:c. A4002C:p.Q1334H
COL4A1	T	G	hom	exonic	nsyn_SNV	COL4A1:NM_001845:exon25:c. A1663C:p.T555P
COL4A1	C	G	hom	exonic	nsyn_SNV	COL4A1:NM_001845:exon1:c.G 19C:p.V7L
DAG1	C	G	hom	exonic	nsyn_SNV	DAG1:NM_001177639:exon2:c. C41G:p.S14W DAG1:NM_001177637:exon3:c. C41G:p.S14W,DAG1 DAG1:NM_001177636:exon4:c. C41G:p.S14W, DAG1:NM_001165928:exon5:c. C41G:p.S14W
DDOST	G	C	hom	exonic	nsyn_SNV	DDOST:NM_005216:exon1:c.C2 2G:p.R8G
DPM2	G	C	het	exonic	nsyn_SNV	DPM2:NM_003863:exon4:c.C2 27G:p.T76S
EFEMP2	T	C	hom	exonic	nsyn_SNV	EFEMP2:NM_016938:exon8:c. A775G:p.I259V
FBLN1	A	G	hom	exonic	nsyn_SNV	FBLN1:NM_001996:exon4:c.A4 22G:p.Q141R
FBLN2	A	G	het	exonic	nsyn_SNV	FBLN2:NM_001004019:exon2: c.A1081G:p.S361G
FBLN2	A	G	hom	exonic	nsyn_SNV	FBLN2:NM_001998:exon11:c.A 2560G:p.T854A FBLN2:NM_001004019:exon 12:c.A2701G:p.T901A
FBN1	C	T	het	splicing	NM_000138:exon30:c.3464 -5G>A	
FBN1	G	C	het	exonic	nsyn_SNV	FBN1:NM_000138:exon28:c.C3 442G:p.P1148A
FBN1	C	T	hom	exonic	nsyn_SNV	FBN1:NM_000138:exon12:c.G1 415A:p.C472Y
FBN2	T	C	het	exonic	nsyn_SNV	FBN2:NM_001999:exon28:c.A3 655G:p.M1219V

Tabla. 36. Mutaciones encontradas por exoma en el paciente 1 para genes candidatos de distroglicanopatía (cont.)

Gene	Ref	Obs	State	Func	ExonicFunc	AAChange
<i>FBN2</i>	C	T	hom	exonic	nsyn_SNV	FBN2:NM_001999:exon23:c.G2893A:p.V965I
<i>FBN3</i>	C	A	het	exonic	nsyn_SNV	FBN3:NM_032447:exon61:c.G7830T:p.E2610D
<i>FBN3</i>	G	T	het	exonic	nsyn_SNV	FBN3:NM_032447:exon46:c.C5873A:p.P1958H
<i>FBN3</i>	G	A	het	exonic	nsyn_SNV	FBN3:NM_032447:exon45:c.C5710T:p.L1904F
<i>FBN3</i>	C	T	het	exonic	nsyn_SNV	FBN3:NM_032447:exon43:c.G5417A:p.R1806Q
<i>FBN3</i>	C	T	het	exonic	nsyn_SNV	FBN3:NM_032447:exon31:c.G3976A:p.V1326I
<i>FBN3</i>	T	C	het	exonic	nsyn_SNV	FBN3:NM_032447:exon30:c.A3877G:p.S1293G
<i>FBN3</i>	C	T	het	exonic	nsyn_SNV	FBN3:NM_032447:exon20:c.G2602A:p.D868N
<i>FBN3</i>	C	T	hom	exonic	nsyn_SNV	FBN3:NM_032447:exon14:c.G1984A:p.D662N
<i>FBN3</i>	G	A	het	exonic	nsyn_SNV	FBN3:NM_032447:exon8:c.C986T:p.P329L
<i>FKTN</i>	G	A	het	exonic	nsyn_SNV	FKTN:NM_006731:exon5:c.G608A:p.R203Q
<i>HMCN1</i>	T	C	hom	exonic	nsyn_SNV	FKTN:NM_001079802:exon6:c.G608A:p.R203Q
<i>HMCN1</i>	A	G	hom	exonic	nsyn_SNV	HMCN1:NM_031935:exon46:c.T7253C:p.I2418T
<i>HMCN1</i>	A	G	hom	exonic	nsyn_SNV	HMCN1:NM_031935:exon56:c.A8678G:p.E2893G
<i>HMCN1</i>	A	G	hom	exonic	nsyn_SNV	HMCN1:NM_031935:exon86:c.A13310G:p.Q4437R
<i>HSPG2</i>	C	T	het	exonic	nsyn_SNV	HSPG2:NM_001291860:exon96:c.G12995A:p.S4332N,HSPG2:NM_005529:exon96:c.G12992A:p.S4331N
<i>HSPG2</i>	C	T	het	splicing	NS_005529:exon80:c.10831-4G>A, NM_001291860:exon80:c.10834-4G>A	
<i>HSPG2</i>	G	A	het	exonic	nsyn_SNV	HSPG2:NM_001291860:exon73:c.C9769T:p.H3257Y
<i>HSPG2</i>	G	A	het	exonic	nsyn_SNV	HSPG2:NM_001291860:exon36:c.C4511T:p.A1504V
<i>HSPG2</i>	T	C	hom	exonic	nsyn_SNV	HSPG2:NM_001291860:exon17:c.A2297G:p.N766S,
<i>HSPG2</i>	T	C	hom	exonic	nsyn_SNV	HSPG2:NM_001291860:exon15:c.A1915G:p.M639V
<i>MOGS</i>	G	A	hom	exonic	nsyn_SNV	MOGS:NM_006302:exon4:c.C877T:p.P293S, MOGS:NM_001146158:exon5:c.C559T:p.P187S
<i>MOGS</i>	C	T	hom	exonic	nsyn_SNV	MOGS:NM_006302:exon3:c.G715A:p.D239N, MOGS:NM_001146158:exon4:c.G397A:p.D133N
<i>PGM1</i>	C	T	het	exonic	nsyn_SNV	PGM1:NM_001172818:exon4:c.C715T:p.R239C
<i>PGM1</i>	T	C	het	exonic	nsyn_SNV	PGM1:NM_001172818:exon8:c.T1312C:p.Y438H
<i>POMGNT1</i>	T	C	hom	exonic	nsyn_SNV	POMGNT1:NM_001290129:exon20:c.A1801G:p.M601V POMGNT1:NM_001290130:exon20:c.A1438G:p.M480V POMGNT1:NM_001243766:exon21:c.A1867G:p.M623V POMGNT1:NM_017739:exon21:c.A1867G:p.M623V
<i>POMT1</i>	A	G	het	exonic	nsyn_SNV	POMT1:NM_007171:exon8:c.A752G:p.Q251R

Tabla. 36. Mutaciones encontradas por exoma en el paciente 1 para genes candidatos de distroglicanopatía (cont.)

Gene	Ref	Obs	State	Func	ExonicFunc	AAChange
POMT1	G	A	het	exonic	nsyn_SNV	POMT1:NM_001136114:exon8: c.G562A:p.V188I
						POMT1:NM_001077366:exon9: c.G751A:p.V251I
						POMT1:NM_001077365: exon10:c.G913A:p.V305I
						POMT1:NM_001136113 exon10:c.G913A:p.V305I
						POMT1:NM_007171:exon10:c. G979A:p.V327I
SLC26A2	T	C	hom	exonic	nsyn_SNV	SLC26A2:NM_000112:exon3:c. T1721C:p.I574T

Tabla 37. Mutaciones en genes de herencia recesiva encontrados por exoma en el paciente 1

Gene	Ref	Obs	State	Func	ExonicFunc	AChange
AADACL3	C	T	het	exonic	unknown	UNKNOWN
ABCA7	C	G	het	exonic	nsyn_SNV	ABCA7:NM_019112:exon21: c.C2892G:p.D964E
ABCA7	T	G	het	exonic	nsyn_SNV	ABCA7:NM_019112:exon46: c.T6212G:p.F2071C
AFAP1L1	G	A	hom	exonic	nsyn_SNV	AFAP1L1:NM_001146337:exon4: c.G293A:p.S98N
ARMC5	A	G	het	exonic	nsyn_SNV	ARMC5:NM_001105247:exon1: c.A121G:p.S41G ARMC5:NM_001288767:exon3: c.A406G:p.S136G
ARMC5	A	G	het	exonic	nsyn_SNV	ARMC5:NM_024742:exon4: c.A1930G:p.M644V
ARPIN, C15orf38- AP3S2	G	A	hom	exonic	nsyn_SNV	C15orf38- AP3S2:NM_001199058:exon4: c.C344T:p.A115V ARPIN:NM_001282380:exon4: c.C56T:p.A19V ARPIN:NM_182616:exon4: c.C344T:p.A115V
BAIAP3	G	A	hom	exonic	nsyn_SNV	BAIAP3:NM_001199096:exon24: c.G2303A:p.R768H BAIAP3:NM_001199097:exon25: c.G2411A:p.R804H BAIAP3:NM_001199098:exon25: c.G2342A:p.R781H BAIAP3:NM_001199099:exon25: c.G2327A:p.R776H BAIAP3:NM_001286464:exon25: c.G2462A:p.R821H BAIAP3:NM_003933:exon25: c.G2516A:p.R839H
C1R	C	T	het	exonic	unknown	UNKNOWN
C2CD3	T	C	het	exonic	nsyn_SNV	C2CD3:NM_001286577:exon23: c.A4511G:p.E1504G
C2CD3	T	C	het	exonic	nsyn_SNV	C2CD3:NM_001286577:exon9: c.A1396G:p.S466G
CDC20B	C	-	het	exonic	frameshift_deletion	CDC20B:NM_001145734:exon8: c.921delG:p.R307fs
CDC20B	T	C	het	splicing	NM_001170402:exon8: c.698-4A>G	
CHML	C	T	het	exonic	nsyn_SNV	CHML:NM_001821:exon1: c.G1052A:p.C351Y
CHML	T	C	het	exonic	nsyn_SNV	CHML:NM_001821:exon1: c.A11G:p.N4S
COL11A2	C	G	hom	exonic	nsyn_SNV	COL11A2:NM_080679:exon62: c.G4563C:p.E1521D COL11A2:NM_080681:exon63: c.G4626C:p.E1542D COL11A2:NM_080680:exon65: c.G4884C:p.E1628D
CROCC	G	A	het	exonic	nsyn_SNV	CROCC:NM_014675:exon23: c.G3461A:p.R1154H
CROCC	G	A	het	exonic	nsyn_SNV	CROCC:NM_014675:exon34: c.G5537A:p.R1846H
DLGAP3	G	T	het	exonic	nsyn_SNV	DLGAP3:NM_001080418:exon1: c.C134A:p.P45H
DLGAP3	G	T	het	exonic	nsyn_SNV	DLGAP3:NM_001080418:exon1: c.C133A:p.P45T
EMG1	T	C	het	exonic	unknown	UNKNOWN
EPG5	G	A	hom	exonic	stopgain	EPG5:NM_020964:exon4: c.C1351T:p.Q451X
FCER1A	A	G	het	exonic	nsyn_SNV	FCER1A:NM_002001:exon4: c.A251G:p.K84R



Tabla 37. Mutaciones en genes de herencia recesiva encontrados por exoma en el paciente 1 (cont.)

Gene	Ref	Obs	State	Func	ExonicFunc	AACChange
FCER1A	G	A	het	exonic	nsyn_SNV	FCER1A:NM_002001:exon4: c.G302A:p.S101N
GAB3	C	G	hom	exonic	nsyn_SNV	GAB3:NM_001081573:exon9: c.G1559C:p.S520T
GLB1L3	A	G	het	exonic	nsyn_SNV	GLB1L3:NM_001080407:exon9: c.A827G:p.N276S
GLB1L3	C	G	het	exonic	nsyn_SNV	GLB1L3:NM_001080407:exon14: c.C1300G:p.R434G
GLB1L3	T	C	het	exonic	nsyn_SNV	GLB1L3:NM_001080407:exon16: c.T1514C:p.L505P
GLTPD2	C	T	hom	exonic	nsyn_SNV	GLTPD2:NM_001014985:exon4: c.C730T:p.R244C
HMCN2	C	T	hom	exonic	unknown	UNKNOWN
HSD17B8	G	T	hom	exonic	nsyn_SNV	HSD17B8:NM_014234:exon1: c.G34T:p.A12S
KCNH8	C	T	het	exonic	nsyn_SNV	KCNH8:NM_144633:exon16: c.C2938T:p.P980S
KCNH8	A	T	het	exonic	nsyn_SNV	KCNH8:NM_144633:exon16: c.A3142T:p.S1048C
KDM5C	T	A	hom	exonic	nsyn_SNV	KDM5C:NM_001146702:exon17: c.A2629T:p.R877W KDM5C:NM_001282622:exon19: c.A2827T:p.R943W
KIAA1462	C	T	hom	exonic	nsyn_SNV	KIAA1462:NM_020848:exon3: c.G334A:p.D112N
KIF26A	C	G	het	exonic	nsyn_SNV	KIF26A:NM_015656:exon4: c.C790G:p.P264A
KIF26A	C	T	het	exonic	nsyn_SNV	KIF26A:NM_015656:exon12: c.C4085T:p.P1362L
KRT78	C	T	het	splicing	NM_173352:exon4: c.600-1G>A)	
KRT78	G	A	het	exonic	nsyn_SNV	KRT78:NM_173352:exon1: c.C217T:p.P73S
MAATS1	C	G	het	exonic	nsyn_SNV	MAATS1:NM_033364:exon3: c.C262G:p.L88V
MAATS1	T	A	het	splicing	NM_033364:exon7: c.860+6T>A)	
MAST2	A	G	het	exonic	nsyn_SNV	MAST2:NM_015112:exon10: c.A1093G:p.M365V
MAST2	G	A	het	exonic	nsyn_SNV	MAST2:NM_015112:exon25: c.G3397A:p.V1133M
MBD3L1	G	C	hom	exonic	nsyn_SNV	MBD3L1:NM_145208:exon1: c.G29C:p.R10P
MTCL1	A	T	het	exonic	nsyn_SNV	MTCL1:NM_015210:exon6: c.A1260T:p.E420D
MTCL1	G	T	het	exonic	nsyn_SNV	MTCL1:NM_015210:exon10: c.G2347T:p.V783L
MTCL1	C	T	het	exonic	nsyn_SNV	MTCL1:NM_015210:exon15: c.C4076T:p.S1359L
MUC17	G	C	het	exonic	nsyn_SNV	MUC17:NM_001040105:exon3: c.G6656C:p.S2219T
MUC17	G	C	het	exonic	nsyn_SNV	MUC17:NM_001040105:exon3: c.G10340C:p.S3447T
MYOCD	G	A	het	exonic	nsyn_SNV	MYOCD:NM_001146312:exon11: c.G2074A:p.D692N
MYOCD	A	G	het	exonic	nsyn_SNV	MYOCD:NM_153604:exon11: c.A2081G:p.D694G, MYOCD:NM_001146312:exon12: c.A2225G:p.D742G
MYOCD	C	A	het	exonic	nsyn_SNV	MYOCD:NM_153604:exon13: c.C2376A:p.S792R MYOCD:NM_001146312:exon14: c.C2520A:p.S840R
OBSCN	G	A	het	exonic	nsyn_SNV	OBSCN:NM_001098623:exon2: c.G367A:p.E123K OBSCN:NM_001271223:exon2: c.G367A:p.E123K

Tabla 37. Mutaciones en genes de herencia recesiva encontrados por exoma en el paciente 1 (cont.)

Gene	Ref	Obs	State	Func	ExonicFunc	AChange
OBSCN	C	T	het	splicing	NM_052843:exon3: c.1258+6C>T	
OR2D3	T	C	het	exonic	nsyn_SNV	OR2D3:NM_001004684:exon1: c.T323C:p.I108T
OR2D3	A	G	het	exonic	nsyn_SNV	OR2D3:NM_001004684:exon1: c.A400G:p.M134V
OR6C2	C	G	het	exonic	nsyn_SNV	OR6C2:NM_054105:exon1: c.C541G:p.P181A
OR6C2	T	C	het	exonic	nsyn_SNV	OR6C2:NM_054105:exon1: c.T599C:p.M200T
PKD1L2	G	A	het	exonic	unknown	UNKNOWN
PLCD3	C	T	het	exonic	unknown	UNKNOWN
PLEKHA4	C	T	het	exonic	nsyn_SNV	PLEKHA4:NM_020904:exon17: c.G1883A:p.R628H
PLEKHA4	G	A	het	exonic	nsyn_SNV	PLEKHA4:NM_001161354:exon7: c.C502T:p.P168S PLEKHA4:NM_020904:exon7: c.C502T:p.P168S
PLXNA3	G	A	hom	exonic	nsyn_SNV	PLXNA3:NM_017514:exon2: c.G214A:p.E72K
RNF17	C	T	het	exonic	nsyn_SNV	RNF17:NM_001184993:exon10: c.C1081T:p.P361S
RNF17	T	C	het	splicing	NM_031277:exon23: c.3204+2T>C)	
RXRB	-	GGTGGA	hom	splicing	NM_021976:exon11: c.1455-4->TCCACC, NM_001270401:exon11: c.1467-4->TCCACC, NM_001291989:exon10: c.897-4->TCCACC)	
RYR3	T	C	het	exonic	nsyn_SNV	RYR3:NM_001036:exon11: c.T1073C:p.I358T
RYR3	T	C	het	splicing	NM_001036:exon55: c.8137-3T>C,	
SEPHS2	G	A	het	exonic	unknown	UNKNOWN
SPON1	G	A	het	exonic	unknown	UNKNOWN
SPTBN5	G	A	het	exonic	nsyn_SNV	SPTBN5:NM_016642:exon10: c.C2005T:p.R669W
SPTBN5	G	A	het	exonic	stopgain	SPTBN5:NM_016642:exon2: c.C214T:p.Q72X
SYN2	C	T	het	exonic	unknown	UNKNOWN
TAB3	G	A	hom	exonic	nsyn_SNV	TAB3:NM_152787:exon11: c.C2006T:p.S669F
THSD7B	G	A	het	exonic	unknown	UNKNOWN
TKTL1	C	G	hom	exonic	nsyn_SNV	TKTL1:NM_001145933:exon1: c.C99G:p.I33M
TNKS1BP1	C	T	het	exonic	nsyn_SNV	TNKS1BP1:NM_033396:exon6: c.G4015A:p.V1339M
TNKS1BP1	T	C	het	exonic	nsyn_SNV	TNKS1BP1:NM_033396:exon5: c.A1676G:p.E559G
TNKS1BP1	C	T	het	exonic	nsyn_SNV	TNKS1BP1:NM_033396:exon5: c.G1675A:p.E559K
TRIM6	C	A	hom	exonic	nsyn_SNV	TRIM6:NM_001198645:exon6: c.C895A:p.P299T TRIM6:NM_001198644:exon7: c.C895A:p.P299T TRIM6:NM_001003818:exon8: c.C1504A:p.P502T TRIM6:NM_058166:exon8: c.C1420A:p.P474T

Tabla 37. Mutaciones en genes de herencia recesiva encontrados por exoma en el paciente 1 (cont.)

Gene	Ref	Obs	State	Func	ExonicFunc	AACChange
TTN	C	T	het	exonic	nsyn_SNV	TTN:NM_133378:exon96: c.G24815A:p.R8272H TTN:NM_001256850:exon97: c.G27596A:p.R9199H TTN:NM_001267550:exon99: c.G28547A:p.R9516H
TTN	T	C	het	exonic	nsyn_SNV	TTN:NM_133378:exon53: c.A12797G:p.Y4266C, TTN:NM_001256850:exon54: c.A15578G:p.Y5193C TTN:NM_001267550:exon56: c.A16529G:p.Y5510C
TTN	A	G	het	exonic	nsyn_SNV	TTN:NM_133379:exon46: c.T11278C:p.Y3760H
TTN	C	T	het	exonic	nsyn_SNV	TTN:NM_003319:exon43: c.G10025A:p.R3342Q TTN:NM_001256850:exon44: c.G10163A:p.R3388Q
WDR46	G	C	hom	exonic	nsyn_SNV	WDR46:NM_005452:exon2: c.C189G:p.I63M
WWC3	C	T	hom	exonic	nsyn_SNV	WWC3:NM_015691:exon7: c.C602T:p.A201V
ZNF274	T	G	het	exonic	unknown	UNKNOWN
ZNF595	C	G	het	exonic	unknown	UNKNOWN
ZZEF1	G	C	het	exonic	nsyn_SNV	ZZEF1:NM_015113:exon47: c.C7568G:p.P2523R
ZZEF1	G	A	het	exonic	nsyn_SNV	ZZEF1:NM_015113:exon3: c.C524T:p.S175L

Tabla 38. Genes infraexpresados por debajo de 20 veces detectados en el clon TALEN-*Fkrp* 29

<i>Gene_Name</i>	<i>log2(fold_change)</i>	<i>FoldChange</i>	<i>p_value</i>	<i>pValueAdjust</i>	<i>Ensembl_Gene_ID</i>
<i>Lrrn1</i>	-11,093	-2184,367679	0,00265	0,00557809	ENSMUSG00000034648
<i>Vldlr</i>	-7,68525	-205,8215167	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000024924
<i>Tspan7</i>	-7,41833	-171,0566048	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000058254
<i>Actn2</i>	-7,36064	-164,3514073	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000052374
<i>Arap2</i>	-7,32493	-160,3332685	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000037999
<i>Zdbf2</i>	-7,32268	-160,0834107	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000027520
<i>Ces2c</i>	-7,20427	-147,4692145	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000061825
<i>Rbm24</i>	-7,08633	-135,8932512	0,00265	0,00557809	ENSMUSG00000038132
<i>Dhrs7c</i>	-6,94525	-123,2334416	0,0091	0,0172341	ENSMUSG00000033044
<i>Wdr16</i>	-6,8599	-116,1544004	0,01545	0,0279123	ENSMUSG00000020904
<i>Ankrd2</i>	-6,83989	-114,5544744	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000025172
<i>Itga4</i>	-6,82138	-113,0941112	0,00015	0,000389302	ENSMUSG00000027009
<i>Clic5</i>	-6,59927	-96,95678796	0,00265	0,00557809	ENSMUSG00000023959
<i>Pvalb</i>	-6,5856	-96,04242993	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000005716
<i>Neu2</i>	-6,50666	-90,92845912	0,0003	0,000746261	ENSMUSG00000079434
<i>Adprhl1</i>	-6,48421	-89,52445961	0,0022	0,00470181	ENSMUSG00000031448
<i>Dnase1l3</i>	-6,43599	-86,58168665	0,00265	0,00557809	ENSMUSG00000025279
<i>Ptpnf</i>	-6,3795	-83,25701906	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000033295
<i>Casq1</i>	-6,3088	-79,275326	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000007122
<i>Cap2</i>	-6,27274	-77,31840653	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000021373
-	-6,23181	-75,15566766	0,00265	0,00557809	XLOC_015098
<i>Bcam</i>	-6,10147	-68,66342895	0,00065	0,00153126	ENSMUSG00000002980
<i>Neb</i>	-6,09444	-68,32965796	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000026950
<i>Mypn</i>	-6,03463	-65,55482204	0,00265	0,00557809	ENSMUSG00000020067
<i>Mest</i>	-5,98096	-63,16090772	0,0011	0,00248365	ENSMUSG00000051855
<i>Pdlim3</i>	-5,97516	-62,90749458	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000031636
<i>Asb16</i>	-5,87794	-58,80797874	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000034768
<i>Atg9b</i>	-5,87162	-58,55092265	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000038295
<i>Rps6ka1</i>	-5,83795	-57,20026795	0,0001	0,000265427	ENSMUSG00000003644
<i>A930016O22Rik</i>	-5,73088	-53,10883583	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000040705
<i>Tgfb1</i>	-5,72382	-52,84957629	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000035493
<i>Heph11</i>	-5,61333	-48,95315709	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000031936
<i>Cox8b</i>	-5,60933	-48,8176181	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000025488
<i>Art1</i>	-5,57389	-47,63301619	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000030996
<i>Pacs1n1</i>	-5,56438	-47,32006007	0,00015	0,000389302	ENSMUSG00000040276
<i>Cacng6</i>	-5,55287	-46,94403674	0,00075	0,00174673	ENSMUSG00000078815
<i>Tekt5</i>	-5,54745	-46,76800554	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000039179
<i>Ckm</i>	-5,5272	-46,11614457	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000030399
<i>Inpp5j</i>	-5,51023	-45,57687172	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000034570
<i>Myo18b</i>	-5,5043	-45,38991873	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000072720
<i>Slc44a4</i>	-5,50019	-45,26079436	0,001	0,00227502	ENSMUSG00000007034
<i>R3hdml</i>	-5,48531	-44,79637231	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000078949
<i>Msln</i>	-5,46199	-44,07809596	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000063011
<i>Abra</i>	-5,45672	-43,91737744	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000042895

Tabla 38. Genes infraexpresados por debajo de 20 veces detectados en el clon TALEN-Fkrp 29 (cont.)

Gene_Name	log2(fold_change)	FoldChange	p_value	pValueAdjust	Ensembl_Gene_ID
<i>Tnni2</i>	-5,44679	-43,61613417	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000031097
<i>Ctsf</i>	-5,4202	-42,8196174	0,00595	0,0117111	ENSMUSG000000083282
<i>Galnt6</i>	-5,39424	-42,05600773	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000037280
<i>Bex1</i>	-5,32375	-40,05054584	0,026	0,0445465	ENSMUSG000000050071
<i>1110059M19Rik</i>	-5,31043	-39,68247213	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000037086
<i>3830417A13Rik</i>	-5,30093	-39,42202554	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000031179
<i>Kcnb1</i>	-5,29193	-39,17686364	0,00265	0,00557809	ENSMUSG000000050556
<i>Nmrk2</i>	-5,26557	-38,46754888	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000004939
<i>Myh4</i>	-5,26248	-38,3852463	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000057003
<i>Tnnc2</i>	-5,20353	-36,84839816	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000017300
<i>Bzrap1</i>	-5,18304	-36,3287545	0,0008	0,00185438	ENSMUSG000000034156
<i>Htatip2</i>	-5,18047	-36,26409649	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000039745
<i>Acsf6</i>	-5,16446	-35,86388815	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000020333
<i>Itgb1bp2</i>	-5,15933	-35,73658818	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000031312
<i>Art3</i>	-5,15572	-35,64727769	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000034842
-	-5,14732	-35,44032675	5,00E-05	0,000137438	XLOC_022137
<i>Acox2</i>	-5,13955	-35,24996696	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000021751
<i>Afap1l1</i>	-5,12919	-34,99774347	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000033032
<i>1600029D21Rik</i>	-5,12752	-34,95725507	0,00265	0,00557809	ENSMUSG000000032068
<i>Pkhd1</i>	-5,12685	-34,94102438	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000043760
<i>Adam22</i>	-5,08454	-33,93118712	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000040537
<i>Psg28</i>	-5,04995	-33,12732944	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000030373
<i>Dmd</i>	-5,04608	-33,03858513	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000045103
<i>Popdc2</i>	-5,02691	-32,60248438	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000022803
-	-5,01314	-32,29278584	5,00E-05	0,000137438	XLOC_033838
<i>Axin2</i>	-5,01137	-32,25319107	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000000142
<i>Cyfp2</i>	-5,00056	-32,01242361	0,0001	0,000265427	ENSMUSG000000020340
<i>Prl2c2</i>	-4,99345	-31,85504565	0,00265	0,00557809	ENSMUSG000000079092
<i>Gm1564</i>	-4,9563	-31,04523614	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000051455
<i>Arpp21</i>	-4,95481	-31,0131895	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000032503
<i>Hspb3</i>	-4,94408	-30,7833855	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000051456
-	-4,93715	-30,63587177	0,00265	0,00557809	XLOC_036407
<i>Hspb7</i>	-4,88296	-29,50648167	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000006221
<i>Mb</i>	-4,84871	-28,81423875	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000018893
<i>Nptx1</i>	-4,84439	-28,72808656	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000025582
<i>Myl4</i>	-4,83436	-28,52905392	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000061086
<i>Mef2c</i>	-4,82351	-28,31530176	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000005583
<i>Atp9a</i>	-4,80945	-28,04069106	0,0003	0,000746261	ENSMUSG000000027546
<i>Gng11</i>	-4,80272	-27,91018922	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000032766
<i>BC051019</i>	-4,79292	-27,72124217	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000031022
<i>Sohlh2</i>	-4,77809	-27,43774477	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000027794
<i>Tnnt3</i>	-4,77535	-27,38568382	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000061723
<i>Xirp1</i>	-4,77426	-27,36500092	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000079243
<i>Prickle1</i>	-4,73198	-26,57467237	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000036158

Tabla 38. Genes infraexpresados por debajo de 20 veces detectados en el clon TALEN-Fkrp 29 (cont.)

Gene_Name	log2(fold_change)	FoldChange	p_value	pValueAdjust	Ensembl_Gene_ID
<i>Slc11a1</i>	-4,72882	-26,51652836	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000026177
<i>Alpk3</i>	-4,70562	-26,09352595	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000038763
<i>Chrng</i>	-4,6971	-25,93988179	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000026253
<i>Bckdhhb</i>	-4,68308	-25,6890209	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000032263
<i>Adora1</i>	-4,68185	-25,66712852	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000042429
<i>Fbxo16</i>	-4,66812	-25,42401543	0,0257	0,0441126	ENSMUSG00000034532
<i>Myoz2</i>	-4,65546	-25,20188953	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000028116
<i>Prdm8</i>	-4,63355	-24,82204373	0,0149	0,0270101	ENSMUSG00000035456
<i>Tnik</i>	-4,63311	-24,81447454	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000027692
<i>Lmod2</i>	-4,61503	-24,50543752	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000029683
<i>Mylpf</i>	-4,61435	-24,49388985	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000030672
<i>Ptgds</i>	-4,60411	-24,32065199	0,0002	0,000509589	ENSMUSG00000015090
<i>1700008105Rik</i>	-4,60202	-24,28544471	0,00265	0,00557809	ENSMUSG000000058252
<i>Capn11</i>	-4,60128	-24,2729912	0,0213	0,0372212	ENSMUSG000000058626
<i>Hs3st3b1</i>	-4,59615	-24,18683348	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG00000070407
<i>Glpr1</i>	-4,59096	-24,09997926	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000056888
<i>Actc1</i>	-4,58917	-24,07009616	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000068614
<i>Macc1</i>	-4,57846	-23,89207085	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000041886
<i>Kif19a</i>	-4,57595	-23,85053958	0,0054	0,0107301	ENSMUSG00000010021
<i>Mybph</i>	-4,57182	-23,78236032	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000042451
<i>Padi2</i>	-4,57056	-23,7615987	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000028927
<i>Casq2</i>	-4,56983	-23,74957843	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000027861
<i>Unc93b1</i>	-4,56542	-23,67709206	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000036908
<i>Klhl31</i>	-4,54411	-23,32992881	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000044938
<i>Klhl13</i>	-4,53919	-23,25050264	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000036782
<i>Casz1</i>	-4,53676	-23,21137367	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000028977
<i>Trim72</i>	-4,53133	-23,12417515	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000042828
<i>Myom3</i>	-4,52756	-23,06382675	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000037139
<i>Fgf13</i>	-4,52428	-23,01145018	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000031137
<i>Pygm</i>	-4,51992	-22,94201176	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000032648
<i>Ryr1</i>	-4,51137	-22,80645012	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000030592
<i>Hrc</i>	-4,50456	-22,69904978	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000038239
<i>Syt8</i>	-4,5044	-22,69653251	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000031098
<i>Serpinb7</i>	-4,50348	-22,68206365	0,0008	0,00185438	ENSMUSG000000067001
<i>Tnnc1</i>	-4,49821	-22,59935981	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000091898
<i>Ablim3</i>	-4,49763	-22,59027612	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000032735
<i>Atp2a1</i>	-4,49451	-22,54147475	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000030730
<i>Erbb3</i>	-4,48707	-22,42552725	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000018166
<i>Obscn</i>	-4,48598	-22,40859048	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000061462
<i>Wnt7b</i>	-4,47449	-22,23083142	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000022382
-	-4,46987	-22,1597546	0,00265	0,00557809	XLOC_015930
<i>Rnf128</i>	-4,45975	-22,00485561	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000031438
<i>Gfra2</i>	-4,45513	-21,93450129	0,00265	0,00557809	ENSMUSG000000022103
<i>Cpa1</i>	-4,45267	-21,89713172	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000054446

Tabla 38. Genes infraexpresados por debajo de 20 veces detectados en el clon TALEN-*Fkrp* 29

<i>Gene_Name</i>	<i>log2(fold_change)</i>	<i>FoldChange</i>	<i>p_value</i>	<i>pValueAdjust</i>	<i>Ensembl_Gene_ID</i>
<i>Trim54</i>	-4,44517	-21,78359258	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000062077
<i>Hhatl</i>	-4,43144	-21,57726344	0,0001	0,000265427	ENSMUSG000000032523
<i>Slc5a5</i>	-4,42256	-21,44486011	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000000792
<i>Ccdc162</i>	-4,40733	-21,21966537	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000075225
<i>Acsbg1</i>	-4,38922	-20,954962	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000032281
<i>Gm7325</i>	-4,36037	-20,54008149	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000079471
<i>Fgf21</i>	-4,35945	-20,52698735	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000030827
<i>Myl6b</i>	-4,35664	-20,48704495	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000039824
<i>Extl1</i>	-4,34922	-20,38194746	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000028838

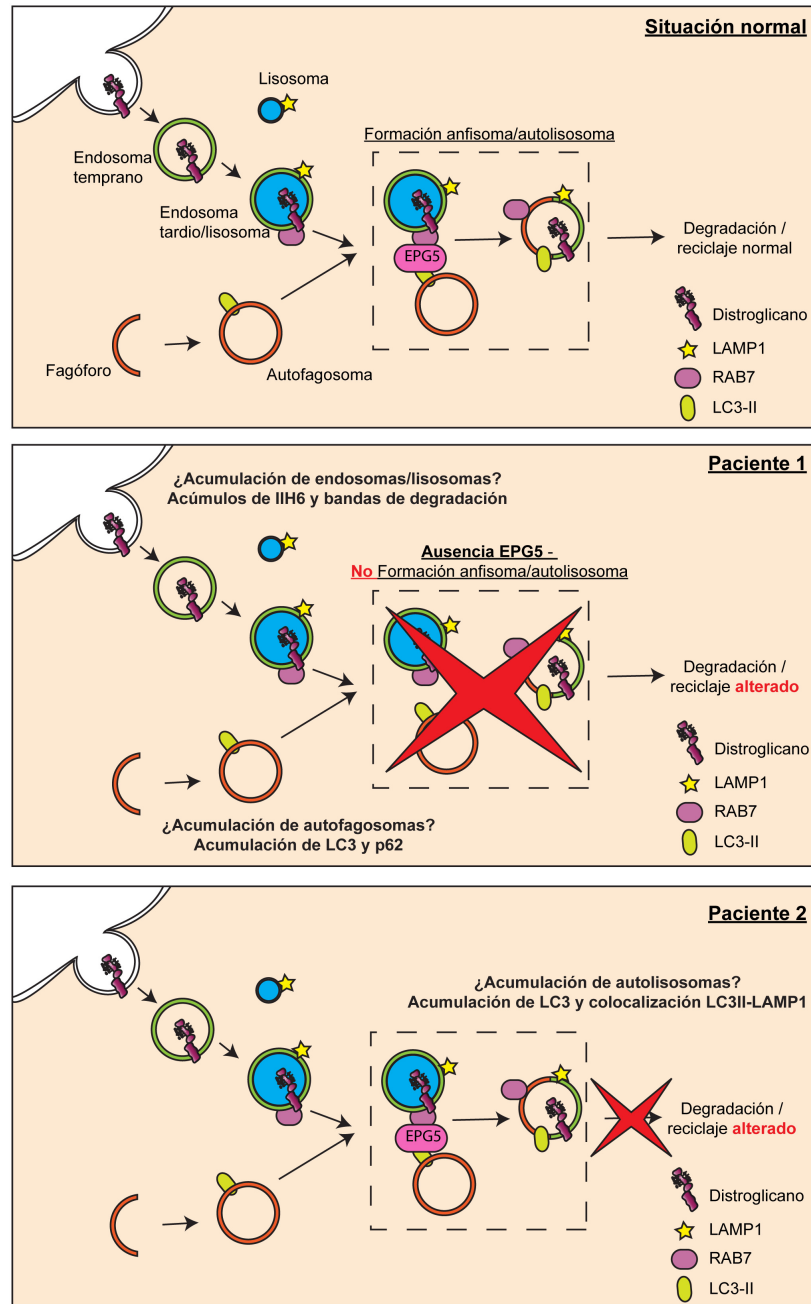
**Tabla 39. Genes sobreexpresados por encima de 10 veces detectados en el clon TALEN-Fkrp 29**

<i>Gene_Name</i>	<i>log2(fold_change)</i>	<i>FoldChange</i>	<i>p_value</i>	<i>pValueAdjust</i>	<i>Ensembl_Gene_ID</i>
<i>Car8</i>	3,34533	10,16353239	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000041261
<i>Col11a1</i>	3,4065	10,60373047	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000027966
<i>Aqp1</i>	3,44497	10,89028647	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000004655
<i>Fmod</i>	3,45314	10,95213325	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG0000000041559
<i>Aff3</i>	3,56309	11,81944182	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000037138
<i>Penk</i>	3,56698	11,85135409	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG0000000045573
<i>Bmp4</i>	3,57136	11,88738929	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000021835
<i>Clec14a</i>	3,74498	13,40760828	0,0005	0,00119906	ENSMUSG0000000045930
<i>Ror1</i>	3,81471	14,07155637	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000035305
<i>Gpr116</i>	3,83139	14,23519154	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG0000000056492
<i>Mt2</i>	3,84065	14,32685458	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000031762
<i>Ranbp3l</i>	3,85288	14,44882229	0,00255	0,00539535	ENSMUSG0000000048424
-	3,91162	15,04925329	0,00265	0,00557809	XLOC_011722
<i>Cdhr1</i>	4,06285	16,71243449	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG000000021803
<i>Doc2b</i>	4,10869	17,25197948	0,00265	0,00557809	ENSMUSG000000020848
<i>Insc</i>	4,26782	19,26379447	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG0000000048782
<i>Galnt15</i>	4,45906	21,99433383	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG0000000021903
<i>Id3</i>	4,62709	24,71114577	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG0000000007872
<i>Cpa6</i>	4,6774	25,58808011	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG0000000042501
<i>Mfap5</i>	4,68047	25,64258854	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG0000000030116
<i>S100b</i>	4,81281	28,10607323	0,0001	0,000265427	ENSMUSG0000000033208
<i>Gm7361</i>	5,22338	37,35889814	0,0026	0,00549356	ENSMUSG0000000059645
<i>Nkd2</i>	5,6995	51,96614015	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG0000000021567
<i>Nov</i>	8,41405	341,0997766	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG0000000037362

**Tabla 40. Diferencia de expresión de los genes *Ttn* y *Csrp3* encontrados en el clon TALEN-Fkrp 29**

<i>Gene_Name</i>	<i>log2(fold_change)</i>	<i>FoldChange</i>	<i>p_value</i>	<i>pValueAdjust</i>	<i>Ensembl_Gene_ID</i>
<i>Ttn</i>	-4,29421	-19,61941337	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG0000000051747
<i>Csrp3</i>	-2,9014	-7,471510815	5,00E-05	0,000137438	ENSMUSG0000000030470





**Figura 35. Mecanismos patológicos propuestos para los pacientes 1 y 2.** Representaciones de la vía endosómica y de autofagia normal y patológica. En el panel superior se muestra la situación normal de ambas vías con la entrada del  $\alpha$ -DG mediante los endosomas, la formación del autofagosoma desde el fagóforo y la fusión que forma el autolisosoma donde participa EPG5. En el panel central, se representa el mecanismo propuesto para el paciente 1 con mutación en EPG5. En él se plantea que la eliminación de EPG5 provoca que se forme el autolisosoma y que esto podría causar la acumulación de los autofagosomas (explicando la acumulación de LC3-II y p62) y la acumulación de endosomas. Este hecho explicaría la acumulación de  $\alpha$ -DG glicosilado en el interior de las fibras (acúmulos IIH6). Por último, en el panel inferior se representa el modelo propuesto para el paciente 2, con causa genética desconocida. En él se plantea que la colocalización de LC3-II y LAMP1 observada, junto con la acumulación de LC3-II, podría explicarse por la formación del autolisosoma. En este caso la patología afectaría a procesos posteriores, quedando el autolisosoma acumulado.

## *Anexo II*

Parte del trabajo realizado por este doctorando en esta tesis doctoral ha dado lugar a la generación del siguiente manuscrito adjunto, que lleva por título:

**Rubio-Fernandez, M.**; Uribe M.L.; Vicente-Tejedor J.; Germain, F.; Susin-Lara, C., Montoliu, L.; de la Villa, P.; Martín-Nieto, J & Cruces, J. (2016). Impairments of photoreceptor synapses in a Pomt1 conditional knockout model of dystroglycanopathy. (en vías de publicación)

Este manuscrito fue enviado recientemente para su publicación en la revista *Nature Neuroscience*, habiendo sido rechazado. Por lo que se está reescribiendo para su envío a la revista *PNAS*.

Este manuscrito solo estará disponible en las versiones impresas para su evaluación por la Comisión de Doctorado y los miembros del tribunal.

También, este doctorando ha participado durante su periodo doctoral en el siguiente trabajo publicado que también se adjunta:

Raducu, M.; Cotarelo, R. P.; Simón, R.; Camacho, A.; **Rubio-Fernández, M.**; Hernández-Laín, A.; Cruces, J. (2014) Clinical features and molecular characterization of a patient with muscle-eye-brain disease: a novel mutation in the *POMGNT1* gene. *J. Child Neurol.*, **29** (2), 289–94.